



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

VANESSA DA SILVA ROCHA

INFLUÊNCIA DA LEPTINA NA REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS
DE AORTA DE RATOS OBESOS

VITÓRIA
2015

VANESSA DA SILVA ROCHA

**INFLUÊNCIA DA LEPTINA NA REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS
DE AORTA DE RATOS OBESOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Educação Física, do Centro de Educação Física e Desportos, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Educação Física - área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Exercício em Modelos Experimentais.

Orientador: Prof. Dr. André Soares Leopoldo

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Holanda da Cunha

VITÓRIA
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP) (Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Rocha, Vanessa da Silva, 1985-

R672i Influência da leptina na reatividade vascular em anéis de aorta de ratos obesos / Vanessa da Silva Rocha. – 2015.
74 f. : il.

Orientador: André Soares Leopoldo. Coorientador: Márcia Regina Holanda da Cunha.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Educação Física e Desportos.

1. Obesidade. 2. Aorta. 3. Endotélio. 4. Leptina. 5. Lipídios - Metabolismo. I. Leopoldo, André Soares. II. Cunha, Márcia Regina Holanda da, 1976-. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Educação Física e Desportos. IV. Título.

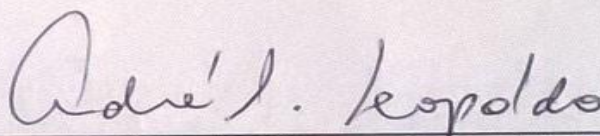
CDU: 796

VANESSA DA SILVA ROCHA

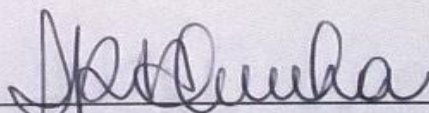
**INFLUÊNCIA DA LEPTINA NA REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS
DE AORTA DE RATOS OBESOS**

Vitória/ES, 25 de junho de 2015.

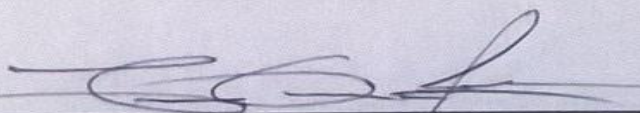
COMISSÃO EXAMINADORA



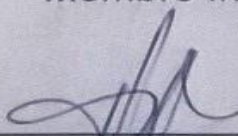
Prof. Dr. André Soares Leopoldo
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Profa. Dra. Márcia Regina Holanda da Cunha
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora



Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno



Prof. Dr. Helder Mauad
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo

Agradecimentos

Em nossa vida por mais que tentamos ser individualistas, ou melhor, independentes é impossível realizarmos algo sozinhos. Por esse motivo não posso deixar de citar o apoio que recebi para a realização deste trabalho.

Agradeço...

A minha família em especial aos meus pais, Alecia e Carlos, que me incentivaram desde o início e nunca mediram esforços em proporcionar o melhor para mim. Amo vocês! Ao meu irmão, Carlos Alexandre, pelo carinho, amizade e cumplicidade. Obrigada por estar ao meu lado, sempre! A minha cunhada, Gabi, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao orientador Professor Dr. André Soares Leopoldo por ter me aceito como sua aluna no mestrado, pela orientação, sabedoria e dedicação, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, incentivos, conselhos científicos e pessoais e, acima de tudo por toda paciência.

À coorientadora Professora Dra. Márcia Regina Holanda da Cunha pelo privilégio e oportunidade de trabalhar e conhecê-la, cada instante que passei ao seu lado foi enriquecedor. Agradeço pela confiança, paciência, ensinamentos, amizade e carinho. A senhora não foi somente orientadora, mas mãe e amiga. Obrigada por estar sempre ao meu lado e acreditar tanto em mim!

À Professora Dra. Ana Paula Lima Leopoldo por ter me encaminhado ao Professor André. Agradeço pelo incentivo e apoio em todos os momentos, pelas valiosas dicas, dedicação e paciência, sempre com conselhos sábios e acima de tudo sinceros. Obrigada por sempre estar disposta a nos ajudar!

Aos Professores Dr. Lucas Guimarães Ferreira e Dr. Hélder Mauad por aceitarem participar da comissão examinadora desta dissertação de Mestrado. Além disso, não poderia deixar de agradecer ao professor Dr. Hélder por me permitir realizar os experimentos em seu laboratório e pelas sugestões na qualificação.

Ao professor Dr. Edson Castardeli pelas sugestões durante a qualificação.

As minhas amigas irmãs, Edna e Grazy, com quem tenho partilhado as alegrias e tristezas desde os tempos de graduação. Obrigada pelo apoio, amizade, incentivo, críticas, ideias e, acima de tudo, pelo ânimo nos dias em que nada parecem dar certo.

As minhas amigas Jeniffer (Kuxa), Renata Josiellê, Jorvânia e Anatália pelo incentivo, apoio e momentos de distração. Em especial a Gisela que em pouco tempo ocupou um espaço importante dando “toques” de uma verdadeira amiga.

Aos colegas integrantes e ex-integrantes do laboratório LAFIBE, Alexandre, Suelen, Wagner, Bruno e Artur e em especial ao Vitor, Felipe e Jóctan pela ajuda na coleta de dados.

Aos amigos e colegas do Centro de Ciências da Saúde da UFES Layla Mendonça, Erick Gonçalves, Cleydiane Vieira, Rafaela Aires, Rafael Stabenow, Paulo Matos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

As secretárias do programa de Pós-Graduação em Educação Física, Suziane e Lucinéa, pelo bom humor e disposição em ajudar em tantos pedidos.

Aos ratos que “doaram” suas vidas em prol a pesquisa contribuindo para a evolução do conhecimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado.

*“É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê.”*

Los Hermanos

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e fator de risco independente para o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares. Estudos experimentais mostram que a indução à obesidade por dieta hiperlipídica insaturada promove alteração vascular caracterizada por melhora na via endotelial L-arginina/Óxido Nítrico (NO). Pesquisas sugerem que a leptina está envolvida nesse processo, sendo capaz de promover vasodilatação pelo aumento da síntese e/ou liberação do NO. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento da leptina na reatividade vascular em anéis de aorta de ratos submetidos à obesidade por meio de dieta com alto teor de gordura insaturada. Ratos *Wistar* com 30 dias de idade foram randomizados em dois grupos: controle (C, n=9) e obeso (Ob, n=7). Os ratos C receberam dieta padrão e os Ob um ciclo de dietas hiperlipídicas insaturadas alternadas diariamente por 27 semanas. Foram analisados o peso corporal final, a gordura corporal total e o índice de adiposidade. O perfil glicêmico foi avaliado pelo teste de tolerância à glicose (GTT) e a pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda. A análise da reatividade vascular foi realizada em anéis de aorta e avaliada por meio de curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-11} a 3×10^{-4} M), acetilcolina (10^{-12} a 10^{-4} M) e leptina (10^{-14} a 3×10^{-6} M) na ausência e na presença de L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico; 100 μ M). Os dados obtidos foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidos ao teste *t* de *Student* e análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste *post-hoc* de *Bonferroni*. O nível de significância considerado foi de 5%. Os resultados mostram que a dieta hiperlipídica insaturada utilizada neste estudo acarretou maior ingestão calórica, elevação do peso e gordura corporal, índice de adiposidade, caracterizando um modelo reprodutível de obesidade. No entanto, não foram visualizadas comorbidades frequentemente associadas com a obesidade experimental, como intolerância à glicose, dislipidemia e hipertensão arterial. A obesidade reduziu a resposta máxima de contração à fenilefrina ($R_{\text{máx}}$ - C: $88,5 \pm 4,8\%$ vs Ob: $61,1 \pm 5,4\%^*$; $p < 0,05$) e a sensibilidade (pD_2 - C: $-6,78 \pm 0,10$ vs Ob: $-7,31 \pm 0,12^*$; $p < 0,05$). Após incubação dos anéis de aorta com L-NAME, nos animais Ob persistiu a diminuição significativa na pD_2 (L-NAME/C: $-7,41 \pm 0,13$ vs L-NAME/Ob: $-7,80 \pm 0,10^\#$; $p < 0,05$) quando

comparados ao C. A obesidade não modificou a vasodilatação induzida pela acetilcolina entre os grupos. Entretanto, após administração do L-NAME, a $R_{\text{máx}}$ (L-NAME/Ob: $4,10 \pm 1,89\%^{\#}$ vs L-NAME/C: $26,54 \pm 5,30\%$; $p < 0,05$) foi menor no grupo Ob quando comparado ao grupo C. Além disso, a vasodilatação induzida pela leptina na presença e ausência de L-NAME não foram alteradas pela obesidade. Em conclusão, a obesidade induzida por dieta hiperlipídica insaturada acarreta diminuição da resposta contrátil sem alteração da resposta vasodilatadora. Além disso, os achados evidenciam que as respostas relaxantes induzidas pela leptina não está alterada em função da obesidade, mas são dependentes da liberação do NO.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta hiperlipídica. Aorta. Endotélio. Leptina.

ABSTRACT

Obesity is a metabolic chronic disease characterized by excessive accumulation of body fat and an independent risk factor for development of cardiovascular disorders. Experimental studies show that the unsaturated high-fat diet-induced obesity promotes vascular alterations characterized by improved endothelial L-arginine/Nitric Oxide (NO) pathway. Research suggest that leptin is involved in this process, being able to promote vasodilation by increase of NO synthesis and/or release. The objective of this study was to evaluate the involvement of leptin on vascular reactivity in aortic rings of rats submitted to obesity by unsaturated high-diet fat. Thirty-day-old male Wistar rats were randomized into two groups: control (C, n=9) and obese (Ob, n=7). The C group was fed a standard diet and the Ob group was alternately submitted to four palatable high-fat diets for 27 weeks. Final body weight, total body fat and adiposity index were assessed. The glycemic profile was evaluated by glucose tolerance test (GTT) and systolic blood pressure (SBP) by tail-cuff plethysmography method. The analysis of vascular reactivity was carried out in aortic segments and assessed by the concentration-response curves to phenylephrine (10^{-11} to 3×10^{-4} M), acetylcholine (10^{-12} to 10^{-4} M) and leptin (10^{-14} to 3×10^{-6} M) in the presence and absence of L-NAME (nonspecific inhibitor of NO synthase, 100 μ M). Data were expressed using descriptive measures of variability position and submitted to Students T-test and two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test. The level of significance was considered to be 5%. The results show that unsaturated high-fat diet used in this study promoted greater calorie intake, elevation of body weight and body fat,—adiposity index, featuring a reproducible model of obesity. However, comorbidities frequently associated to experimental obesity were not visualized, such as glucose intolerance, dyslipidemia and hypertension. Obesity reduced the maximum response to phenylephrine (R_{max} - C: $88.5 \pm 4.8\%$ vs Ob: $61.1 \pm 5.4\%^*$; $p < 0.05$) and sensibility (pD_2 - C: -6.78 ± 0.10 vs Ob: $-7.31 \pm 0.12^*$; $p < 0.05$). After incubation of aortic rings with L-NAME, in Ob group persisted significant decrease in pD_2 (L-NAME/C: -7.41 ± 0.13 vs L-NAME/Ob: $-7.80 \pm 0.10^\#$; $p < 0.05$) than C. Obesity lead did not change the vasodilation induced by acetylcholine between groups. However, after administration of L-NAME, the R_{max} (L-NAME/Ob: $4.10 \pm 1.89\%^\#$ vs L-NAME/C: $26.54 \pm 5.30\%$; $p < 0.05$) was lower in the

Ob group compared to C. Furthermore, the vasodilation induced by leptin in the presence and absence of L-NAME were not altered by obesity. In conclusion, obesity induced unsaturated fat diet leads to decreased contractile response without changing the vasodilator response. Furthermore, the findings show that leptin-induced relaxation response is not altered due to the obesity, but are dependent on the release of NO.

Keywords: Obesity. High-fat diet. Aorta. Endothelium. Leptin.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição de macro e micronutrientes das rações	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização da leptina: JAK-2/STAT3 e IRS-1/PI-3K/Akt	19
Figura 2. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso	26
Figura 3. Esquematização do sistema para estudo de reatividade de anéis de aorta	30
Figura 4. Registro do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio	32
Figura 5. Protocolos experimentais realizados na reatividade vascular em aortas torácicas de ratos controle e obeso	34
Figura 6. Representação esquemática dos parâmetros funcionais da curva de cumulativa de concentração-resposta	34
Figura 7. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle e obeso	37
Figura 8. Perfil e Área sobre a curva glicêmica.	40
Figura 9. Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos <i>Wistar</i> na presença ou ausência de L-NAME	45
Figura 10. (A) Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$), (B) Sensibilidade (pD_2) e (C) Diferença da área abaixo da curva (dAUC) da curva de concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos <i>Wistar</i> na presença ou ausência de L-NAME	45
Figura 11. Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos <i>Wistar</i> na presença ou ausência de L-NAME	46
Figura 12. (A) Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$), (B) Sensibilidade (pD_2) e (C) Diferença da área abaixo da curva (dAUC) da curva de concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos <i>Wistar</i> na presença ou ausência de L-NAME	47
Figura 13. Curva concentração-resposta à leptina em anéis de aorta torácica de ratos <i>Wistar</i> na presença ou ausência de L-NAME	48
Figura 14. (A) Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$), (B) Sensibilidade (pD_2) e (C) Diferença da área abaixo da curva (dAUC) da curva de concentração-resposta à leptina em anéis de aorta torácica de ratos <i>Wistar</i> na presença ou ausência de L-NAME	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais	38
Tabela 2. Características nutricionais	39
Tabela 3. Análise bioquímica	41
Tabela 4. Características morfológicas cardíacas	42
Tabela 5. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	43

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	15
2- OBJETIVO	21
2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3- MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1- ANIMAIS	22
3.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS	22
3.2.1- Composição das rações padrão e hiperlipídica	23
3.3- DETERMINAÇÃO NUTRICIONAL	24
3.4- ANÁLISE LIPÍDICA E PROTEICA	25
3.5- CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE	25
3.6- CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E OBESO	26
3.7- OBESIDADE E COMORBIDADES	27
3.7.2- Intolerância à glicose	28
3.7.3- Dislipidemias e Hiperglicemia	28
3.7.4- Estrutura do coração <i>post mortem</i>	28
3.7.5- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático	29
3.8- AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR	29
3.8.1- Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)	31
3.8.2- Avaliação da integridade funcional do endotélio	31
3.8.3- Protocolos experimentais	32
3.8.3.1- <i>Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta de ratos obesos</i>	32
3.8.3.2- <i>Avaliação das respostas vasodilatadoras dependente do endotélio vascular em anéis de aorta de ratos obesos</i>	33

3.8.3.3- Avaliação da participação da via da síntese de óxido nítrico em anéis de aorta de ratos obesos.....	33
3.8.4- Parâmetros funcionais.....	34
3.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4- RESULTADOS	36
4.1- COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E OBESO	36
4.2- CARACTERIZAÇÃO DO INÍCIO DA OBESIDADE	36
4.3- PERFIL NUTRICIONAL	39
4.4- COMORBIDADES.....	40
4.5- ESTRUTURA DO CORAÇÃO POST MORTEM	42
4.6- TEOR DE ÁGUA NOS TECIDOS CARDÍACO, PULMONAR E HEPÁTICO	43
4.7- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR IN VITRO	44
4.7.1- Avaliação do efeito da obesidade sobre a reatividade vascular nos anéis isolados de aorta e a produção de óxido nítrico	44
4.7.2- Participação do óxido nítrico na modulação da resposta vasodilatadora à acetilcolina.....	46
4.7.3- Relaxamento induzido pela leptina e a participação do óxido nítrico na modulação da resposta vasodilatadora	48
5- DISCUSSÃO	50
5.1- PERFIL NUTRICIONAL	51
5.2- COMORBIDADES.....	53
5.3- ESTRUTURA DO CORAÇÃO POST MORTEM	55
5.4- REATIVIDADE VASCULAR	56
6- REFERÊNCIAS	64
ANEXO	73

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença caracterizada pelo excesso de gordura corporal e reconhecida como epidemia global, uma vez que afeta praticamente todas as faixas etárias e classes sociais tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento⁽¹⁾. Atualmente é considerada um problema de saúde pública devido a sua crescente prevalência. Estima-se que em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos, acima de 18 anos, apresentavam sobrepeso, dos quais mais de 600 milhões estavam obesos⁽²⁾. No Brasil, segundo Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁽³⁾, cerca de 48,5% da população adulta apresenta sobrepeso, e 15,8% são obesos. A previsão para 2025 é que 35% da população brasileira será obesa, caso não sejam tomadas medidas preventivas para essa doença⁽⁴⁾.

A etiologia da obesidade é complexa, desde que apresenta múltiplas causas que podem ser decorrente da interação de fatores genéticos, metabólicos, psicológicos, comportamentais e ambientais⁽⁵⁾. No entanto, as causas mais comuns para a ocorrência de obesidade são o aumento do consumo alimentar calórico e o sedentarismo, os quais levam a um balanço calórico positivo e, consequentemente, aumento de gordura corporal⁽⁶⁾. Dentro desse contexto, a obesidade se consolidou como agravo nutricional associado à alta incidência de morbidades, respiratórias, osteoarticulares, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, alguns tipos de câncer e, principalmente, doenças cardiovasculares, as quais estão associadas com aumento da mortalidade e redução na expectativa de vida⁽⁷⁾.

O tecido adiposo deixou de ser considerado apenas um órgão passivo que armazena energia, sendo atualmente, relatado como um órgão parácrino e

endócrino que libera diversas adipocinas, tais como: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), adipina, angiotensinogênio, adiponectina, resistina, leptina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), as quais podem contribuir para a disfunção endotelial⁽⁸⁾.

A disfunção endotelial é caracterizada por desequilíbrio na produção de substâncias relaxantes (óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivados do endotélio) e constritoras (endotelina, prostanóides, angiotensina e espécies reativas de oxigênio) que podem comprometer a integridade do vaso afetando na manutenção do tônus e da homeostase vascular⁽⁹⁾.

A disfunção endotelial associada à obesidade tem sido considerada um processo inicial para o desenvolvimento da aterosclerose, bem como fator de risco para lesão arterial e, conseqüentemente, elevação do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares^(10,11). Estudos têm demonstrado que indivíduos obesos apresentam prejuízo na função arterial caracterizado pela redução da vasodilatação dependente do endotélio, que se constitui em um dos principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares^(12,13).

Em modelos animais induzidos por dieta hipercalórica também é visualizado prejuízo no relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias mesentéricas^(14,15). Fatani et al.⁽¹⁶⁾ apontam que animais alimentados a partir de dieta com alto teor de gordura saturada apresentam resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl) e a noradrenalina (NA) semelhante ao grupo controle, enquanto o relaxamento em resposta ao carbocol e nitruoprussiato de sódio (NPS), é atenuada em artérias mesentéricas; esses achados indicam que a dieta hiperlipídica saturada promove disfunção vascular. Outros autores não encontraram diferença no relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina (ACh) em aorta de

camundongos e de coelhos obesos induzidos por dieta hiperlipídica^(17,18). Pesquisas recentes em nosso laboratório revelaram que ratos induzidos à obesidade, por dieta com alto teor em gordura insaturada, apresentam melhora na resposta vasomotora da via endotelial vascular em anéis de aortas torácicas^(19,20). Os autores sugerem que a melhora observada na via L-arginina de animais obesos foi decorrente do aumento dos níveis de insulina e leptina, ambos responsáveis pelo aumento da produção e liberação do óxido nítrico.

Dentro deste contexto, a literatura relata que os efeitos da obesidade sobre o sistema cardiovascular, em especial sobre o endotélio vascular tanto em humanos quanto em animais, são produtos de diversos mecanismos envolvidos na alteração da função endotelial, os quais ainda não estão totalmente esclarecidos⁽²¹⁾. Diversos fatores como resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial, têm sido citados como responsáveis por possíveis disfunções cardiovasculares em modelos de obesidade. Além disso, a hiperleptinemia decorrente da obesidade estimula o sistema nervoso simpático que contribui na alteração da pressão sanguínea, bem como pode também promover vasodilatação, produzindo e liberando óxido nítrico (NO)⁽²²⁾ que se difunde facilmente pelas membranas celulares⁽²³⁾. Assim, esse duplo comportamento da leptina pode ajudar a esclarecer porque a obesidade nem sempre é acompanhada de hipertensão arterial.

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo que apresenta níveis plasmáticos elevados na obesidade, tanto em humanos quanto em roedores⁽²⁴⁾. Esse hormônio atua centralmente no controle da ingestão alimentar que age no hipotálamo inibindo a biossíntese e a secreção do neuropeptídeo Y (NPY) e do peptídeo agouti (AgRP), mecanismos relacionados com a regulação da fome e do apetite^(25,26). Além de controlar os estoques de energia, a leptina está envolvida em

vários outros processos fisiológicos, entre eles a modulação do tônus vascular, atuando por meio de receptores específicos localizados no endotélio vascular⁽²⁷⁾. O receptor de leptina apresenta seis diferentes isoformas Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re e Ob-Rf⁽²⁸⁾, sendo que no endotélio vascular o receptor mais abundante refere-se ao tipo Ob-Rb.

A ação da leptina ocorre a partir da ligação com o receptor a janus quinase 2 (JAK2), a qual é ativada e fosforila outros resíduos de tirosina que irão mediar a sinalização intracelular nos quatro resíduos de tirosina (Tyr⁹⁷⁴, Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷ e Tyr¹¹³⁸), sendo que, cada uma está associado à ativação de vias de sinalização distintas. A fosforilação dos resíduos de tirosina, Tyr¹⁰⁷⁷ e Tyr¹¹³⁸ ligam-se às proteínas transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) que são ativadas e translocadas para o núcleo para estimular a transcrição do gene. Ambos Tyr¹⁰⁷⁷ e Tyr¹¹³⁸ ligam a STAT5 enquanto apenas Tyr¹¹³⁸ recruta STAT1 e STAT3. Os outros dois resíduos fosforilados Tyr⁹⁸⁵ Tyr⁹⁷⁴ recrutam e ativam a enzima proteína tirosina fosfatase contendo o domínio SH2 (SHP-2). Essa enzima atua na ativação na via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) culminando com a ativação da quinase regulada por sinais extracelulares (ERKs). A Tyr⁹⁷⁴ também promove o recrutamento e a fosforilação das proteínas dos substratos do receptor de insulina (IRS 1/2), as quais são responsáveis pela ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Essa enzima ativa a proteína quinase B (Akt) e a proteína quinase A (PKA), que fosforila a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) resultando na produção de óxido nítrico, conforme visualizado na Figura 1^(27,29).

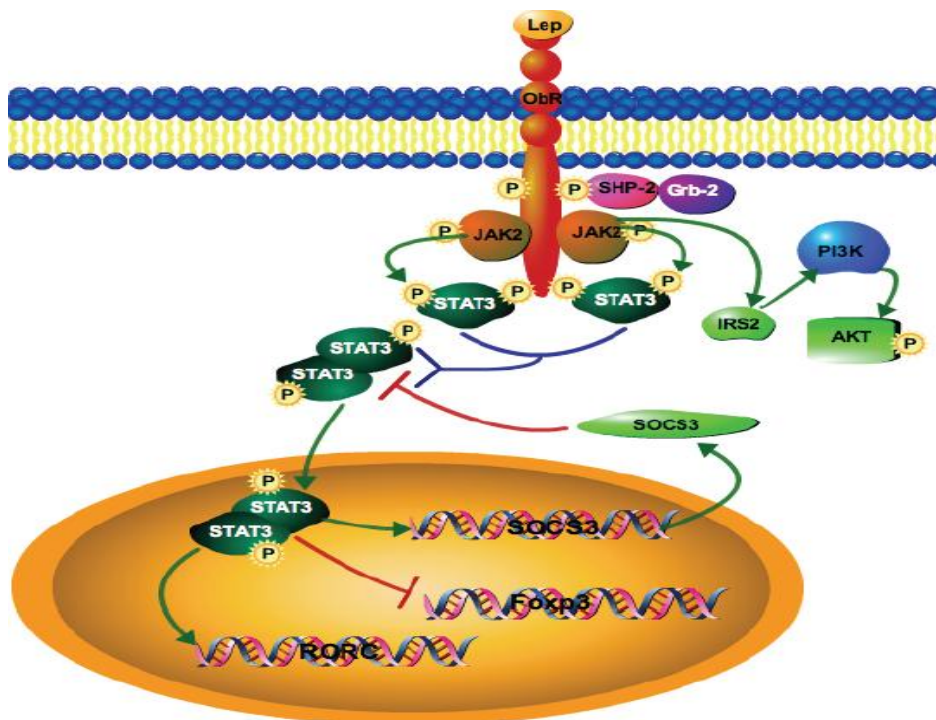


Figura 1. Vias de sinalização da leptina: JAK-2/STAT3 e IRS-1/PI-3K/Akt⁽³⁰⁾.

Como relatado anteriormente, Nascimento et al.⁽¹⁹⁻²⁰⁾ mostram que animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica insaturada apresentaram elevados níveis plasmáticos de leptina e aumento na resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Os autores sugerem que a hiperleptinemia pode estar relacionada com a resposta vasodilatadora devido ao aumento na produção de óxido nítrico, no entanto outros estudos têm relatado prejuízo da via NO na obesidade^(14,15,31). A discrepância observada entre os achados pode ser devido aos modelos de obesidade utilizados, os quais variam desde modelos genéticos a diversos modelos de dieta^(32,33,34). A literatura mostra que, nas artérias mesentérica e aorta, a leptina não estimula apenas a produção e liberação do óxido nítrico, mas a produção de outros mediadores, entre eles, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE)^(35,36), ambos induzem a vasodilatação. Além disso, a

resposta vasodilatadora estimulada pela leptina mostrou-se dependente da integridade do endotélio vascular⁽³⁶⁾.

Em razão da carência de estudos que avaliaram os mecanismos pelo qual a leptina modula as diferentes respostas no endotélio vascular de modelos de obesidade, a proposta do estudo foi investigar a participação da leptina na função vascular de ratos obesos submetidos à dieta com alto teor de gordura insaturada. A hipótese do estudo é de que a leptina aumenta a resposta vasodilatadora nos anéis de aorta de ratos obesos.

2- OBJETIVO

O presente estudo avaliou a participação da leptina na reatividade vascular em artéria de condutância (aorta) de ratos submetidos à obesidade por meio de dieta com alto teor de gordura insaturada.

2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do modelo de obesidade por dieta hiperlipídica insaturada;
- Avaliação da reatividade vascular em anéis aorta isolada de ratos:
 - Participação α_1 -adrenérgica (fenilefrina);
 - Relaxamento dependente (ACh e leptina) do endotélio;
 - Participação da via do NO, mediante bloqueio farmacológico com L-NAME, na reatividade vascular à fenilefrina;
 - Síntese de NO na resposta vasodilatadora endotélio-dependente (ACh e leptina) com inibição da via do óxido nítrico sintase endotelial com L-NAME.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* (*Ratus norvegicus albinus*), com 30 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram alocados e mantidos sob as seguintes condições na sala de passagem do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental do Centro de Educação Física da UFES: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus*, temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ambiente ($55 \pm 5\%$) controladas e ciclos de iluminação de 12:12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “U.S. National Institutes of Health” e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES (Protocolo nº. 027/2014) (Anexo A).

3.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram randomizados em dois grupos: alimentados com dieta normocalórica (C: n=15) e dieta hiperlipídica (Ob: n=15). Após seleção e distribuição dos grupos experimentais, um animal de cada grupo veio a óbito, permanecendo, 14 animais em cada grupo (C: n=14; Ob: n=14). Os ratos C receberam ração padrão (Presence ratos e camundongos[®], São Paulo, Brasil) para roedores e os Ob um ciclo

de quatro rações hiperlipídicas (Biotron Zootecnica[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil), diferindo apenas no sabor, e não nos micro e macronutrientes, sendo alternadas a cada 24 horas por um período de 27 semanas. Os ratos C e Ob receberam diariamente 50g de ração e após 24 horas o que não foi ingerido era mensurado para avaliação da ingestão alimentar. A oferta de água foi *ad libitum*.

3.2.1- Composição das rações padrão e hiperlipídica

A ração padrão Presence ratos e camundongos[®] é composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico. O grupo obeso recebeu um ciclo de quatro dietas hiperlipídicas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416) e que apresentam as mesmas composições nutricionais, de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado proteico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplemento mineral e vitamínico, diferenciando-se nos aditivos flavorizantes queijo, bacon, chocolate e baunilha.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hiperlipídica, mensurada pela empresa Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil, está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1. Composição de macro e micronutrientes das rações

Componentes	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Proteína (%)	23,0	20,0
Carboidrato (%)	42,8	26,4
Gordura (%)	4,0	20,0
Vitaminas e Minerais (%)	12,1	12,1
Fibras (%)	5,0	9,0
Umidade (%)	13,0	12,5
Calorias (Kcal/g)	2,99	3,65
% Calorias da proteína	30,7	21,9
% Calorias do carboidrato	57,3	28,9
% Calorias da gordura	12,0	49,2

3.3- DETERMINAÇÃO NUTRICIONAL

O perfil nutricional foi determinado por meio da ingestão alimentar e calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal e índice de adiposidade. O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). A eficiência alimentar, capacidade dos animais converterem energia alimentar consumida em peso corporal, foi mensurada dividindo-se o ganho de peso corporal (g) pela ingestão calórica total (Kcal) multiplicado por 100. A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal total pelo peso corporal final, multiplicado por 100⁽³⁷⁾.

3.4- ANÁLISE LIPÍDICA E PROTEICA

Para análise do perfil lipídico e proteico, os ratos foram mantidos em jejum de 12 a 15 horas, anestesiados com solução a 10% de hidrato de cloral ($0,4\text{mL} \cdot 100\text{g}^{-1}$ - ip) e eutanasiados por decapitação. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Falcon*, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C (Thermo Fisher Scientific LLC, Asheville, NC, USA). As concentrações séricas de triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de alta (HDL) e baixa intensidade (LDL) e proteína foram determinadas utilizando-se *kits* específicos (Bioclin Bioquímica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e analisadas pelo analisador bioquímico automatizado BS-200E (Mindray do Brasil - Comércio e Distribuição de Equipamentos Médicos Ltda, São Paulo, Brasil).

3.5- CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE

No final do protocolo experimental, o índice de adiposidade foi utilizado como indicador de obesidade. Esse método é de baixo custo e facilmente realizado, pois permite avaliar a quantidade de gordura corporal de maneira precisa e consistente. Diversos estudos têm utilizado esse índice como ferramenta para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores^(34,38).

3.6- CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E OBESO

Em estudos, principalmente experimentais, mesmo quando mantidas condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada homogeneidade de resposta. Nesse sentido, ratos submetidos à ração normocalórica e hiperlipídica podem apresentar em menor ou maior escala características comuns, por exemplo, o índice de adiposidade. Estudo publicado previamente⁽³⁹⁾ mostrou que esse fato pode conduzir a erros de classificação, ou seja, animais submetidos à ração normocalórica poderiam ser classificados como controle, quando na realidade exibem características de animais obesos ou vice versa. Por essa razão, tornou-se necessário estabelecer um critério que separasse os animais em dois grupos distintos de acordo com índice de adiposidade.

Dessa forma, foi constituído um intervalo de confiança (IC) de 95% para a média do índice de adiposidade dos grupos controle e obeso. Adotou-se como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do C e o limite inferior do Ob. A partir desse ponto foi excluído do grupo C, os animais com índice de adiposidade acima do PS pertencentes ao grupo C. No grupo Ob, os animais com índice de adiposidade abaixo do PS foram excluídos, conforme mostrado na Figura 2.

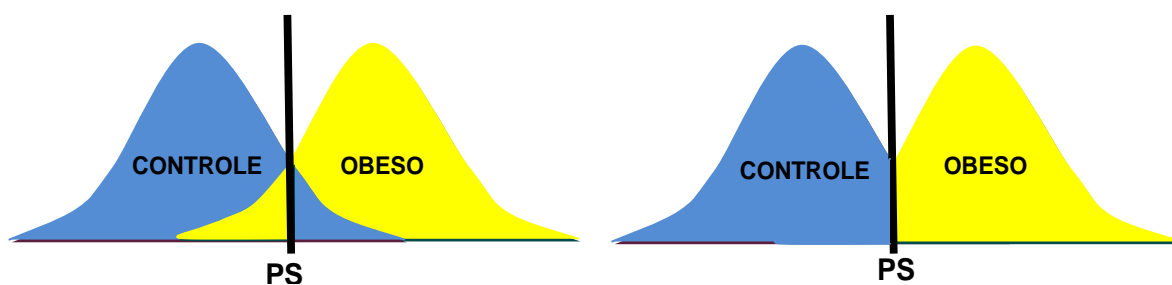


Figura 2. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso⁽⁴⁰⁾.

3.7- OBESIDADE E COMORBIDADES

A obesidade desenvolvida por dieta hiperlipídica pode apresentar alterações no perfil cardiovascular, metabólico e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^(35,38,41). Dentro desse contexto, essas morbidades foram avaliadas nos grupos a partir das seguintes variáveis:

3.7.1- Pressão Arterial Sistólica

A hipertensão arterial sistêmica foi avaliada em ambos os grupos por meio da análise da pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi determinada de maneira indireta, após o término do protocolo experimental, por meio do método de pletismografia de cauda (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA). Os animais foram acomodados na câmara aquecida, com temperatura variando de 29° a 32°C; na região proximal da cauda dos animais foi conectado um manguito de borracha (*cuff*), o qual foi insuflado até 200-250 mmHg e desinsuflado automaticamente. Os valores da PAS, obtido por meio dos sinais do transdutor acoplado ao computador, foram analisados em um software específico (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA). Foram realizadas pelo menos três medidas em cada animal para obtenção de um registro médio.

3.7.2- Intolerância à glicose

Como os animais obesos podem apresentar níveis glicêmicos normais em condições basais, foi analisado o perfil glicêmico após sobrecarga de glicose. As coletas sanguíneas na artéria caudal foram realizadas após um período de jejum de 6 horas e administração intraperitoneal de glicose a 25% (Sigma-Aldrich,[®] St Louis, MO, USA), equivalente a 2 g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal, e após 15', 30', 60', 90' e 120' minutos da infusão de glicose⁽¹⁹⁾. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil). A intolerância à glicose foi avaliada pelo perfil da curva e área glicêmica.

3.7.3- Dislipidemias e Hiperglicemia

As concentrações séricas de triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de alta (HDL) e baixa densidade (LDL) e proteína foram avaliadas conforme metodologia utilizada e descrita no item 3.4.

3.7.4- Estrutura do coração *post mortem*

O processo de remodelação cardíaca foi avaliado por análise estrutural macroscópica das câmaras cardíacas *post mortem*, a fim de identificar presença de hipertrofia cardíaca a nível atrial e ventricular^(42,43). Os animais foram anestesiados com 10% de hidrato de cloral e eutanasiados por decapitação. O coração dos

animais foi removido e dissecado e pesado em balança de precisão (AD 500, Marte Científica e Instrumentação Industrial LTDA, Minas Gerais, Brasil). Para avaliar o grau de hipertrofia cardíaca foi avaliado o peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e dos átrios (AT), bem como as relações VE, VD e AT pelo comprimento da tíbia, que foi removida e limpa dos tecidos circundantes moles e o comprimento determinado com paquímetro (ZAAS Precision - Amatools Comercial e Importadora Ltda).

3.7.5- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A obesidade pode acarretar aumento na volemia corporal⁽⁴⁴⁾, o que pode promover acúmulo de líquidos nos tecidos. Portanto, foi realizada a avaliação do teor de água tecidual nos ventrículos esquerdo e direito, átrio, pulmão e fígado. Após a remoção e separação dos tecidos foram mantidos em estufa a $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para desidratação e posteriormente serem pesadas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: $[(\text{PN}-\text{PS})/\text{PN}] \times 100\%$, onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

3.8- AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR

A técnica de reatividade vascular *in vitro* permite avaliar a tensão isométrica gerada por agonistas e antagonistas em anéis de aortas vasculares, bem como detectar alterações na capacidade dos anéis em contrair e relaxar⁽⁴⁵⁾.

Os animais foram anestesiados com solução a 10% de hidrato de cloral (0,4mL. 100g⁻¹ – intraperitoneal) e, posteriormente, decapitados com guilhotina. Em seguida, foi realizada incisão no abdome do animal, através da qual retirou-se um segmento de aorta torácica de aproximadamente 3 cm. Esse fragmento foi colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de *Krebs-Henseleit* (em mM: NaCl, 124; KCl, 46; CaCl₂.2H₂O, 2,5; MgSO₄.7H₂O, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; EDTA, 0,01). Após esse procedimento, a aorta torácica foi dissecada para a remoção dos tecidos conectivo e adiposo e dividida em três anéis de aproximadamente 4 a 5 mm de comprimento cada. Os anéis foram acoplados e montados em cubas de órgãos isolados.

Para a aquisição do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi suspenso em um par de ganchos inoxidável em cubas de vidro, contendo 5 ml de solução de *Krebs-Henseleit* mantida à temperatura de 36,5°C e aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), pH de 7,4 conforme descrito por Marin et al.⁽⁴⁶⁾. Um gancho encontra-se fixo na parte inferior da cuba e o outro conectado a um transdutor de força (TSD 125), interligado ao sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac System, Inc; Santa Bárbara, CA-USA). Esse sistema é acoplado a um computador para o registro da tensão isométrica desenvolvida pelo vaso (Figura 3).

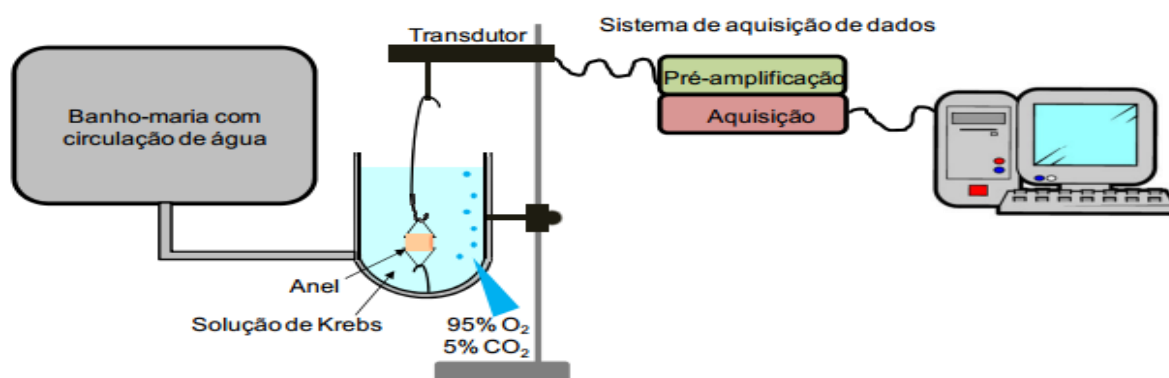


Figura 3. Esquematização do sistema para estudo de reatividade de anéis de aorta⁽⁴⁷⁾.

3.8.1- Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Os anéis de aorta vasculares foram submetidos a uma tensão de repouso de 1g, reajustado quando necessário durante o período de estabilização de 30 minutos (Figura 4A). Após o período de estabilização, foi adicionado KCl (75 mM) nas cubas para verificar a atividade contrátil induzida por despolarização e, assim, verificar a viabilidade do músculo liso vascular que devia gerar uma variação de um grama de força a partir do valor basal (Figuras 4B e C). Os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados.

Em seguida, foi realizada a troca da solução nutritora das cubas até retornar a tensão de repouso. Após estabilização de 30 minutos (Figura 4D), uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada nas cubas para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular por 30 minutos, tempo suficiente para atingir um platô no registro da contração (Figuras 4E e F). Após esse platô, os anéis foram novamente lavados para que os mesmos retornassem a tensão de repouso e, depois de 30 minutos (Figura 4G), os anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.8.2- Avaliação da integridade funcional do endotélio

Em seguida, após assegurado a viabilidade dos anéis, foi realizado o teste de integridade funcional do endotélio, que consisti na administração e verificação de sua capacidade de relaxar com acetilcolina (ACh, 10^{-5} M, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (Fe, 10^{-6} M, Sigma-

Aldrich[®], St Louis, MO, USA) (Figuras 4H e I). O endotélio vascular foi considerado íntegro nos anéis de aorta com relaxamento igual ou superior que 80% da contração induzida pela Fe. As curvas de concentração-resposta foram realizadas em anéis de aorta com endotélio preservado. A seguir serão detalhados os protocolos experimentais realizados.

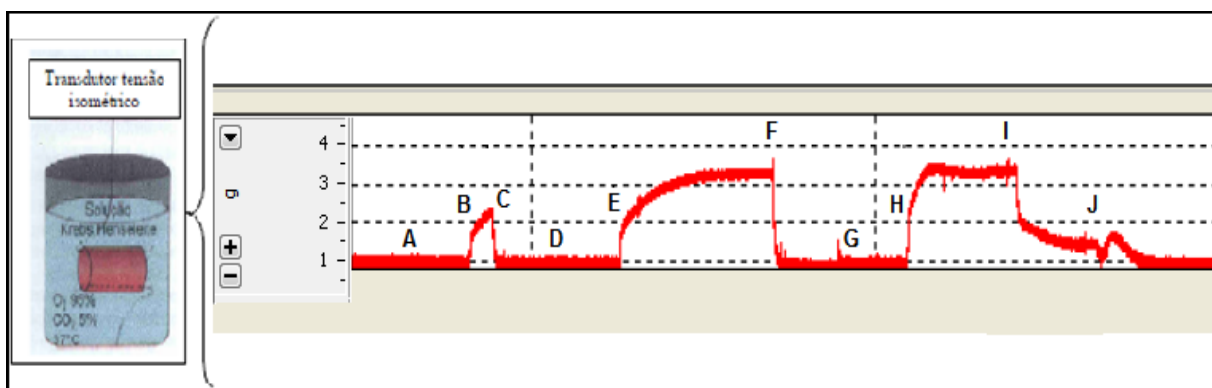


Figura 4. Registro do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:** A) Período inicial de estabilização (30 min permanecendo na tensão de aproximadamente 1 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho (por 30 min); F) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; G) Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio:** H) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; I) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M; J) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit (adaptado de Angeli, 2009)⁽⁴⁸⁾.

3.8.3- Protocolos experimentais

3.8.3.1- Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta de ratos obesos

Após 30 minutos da avaliação da contração induzida pelo KCl (75 mM), foram realizadas curvas de concentração-resposta ao agonista α_1 -adrenérgico, utilizando a fenilefrina em doses cumulativas (10^{-11} a 3×10^{-4} M, Sigma-Aldrich, [®] St Louis, MO,

USA) (Figura 5A). Esse protocolo tem como finalidade avaliar a resposta contrátil usando-se a via de sinalização intracelular através de receptores de membrana.

3.8.3.2- Avaliação das respostas vasodilatadoras dependente do endotélio vascular em anéis de aorta de ratos obesos

Após período de estabilização, os anéis de aorta foram pré-contraídos com concentração submáxima de fenilefrina (10^{-6} M, Sigma-Aldrich, [®] St Louis, MO, USA). Em seguida, a partir da obtenção de um platô, foram realizadas curvas de concentração-resposta cumulativa aos agonista muscarínico (M_3)⁽⁴⁹⁾, acetilcolina (10^{-12} a 10^{-4} M, Sigma) (Figura 4B) e de leptina (10^{-14} a 3×10^{-6} M, Sigma-Aldrich, [®] St Louis, MO) (Figura 5C).

3.8.3.3- Avaliação da participação da via da síntese de óxido nítrico em anéis de aorta de ratos obesos

Com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora e vasodilatadora, os anéis vasculares foram incubados por 30 minutos com inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico (NOS), *N^W-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME, 100 μ M, Sigma-Aldrich, [®] St Louis, MO, USA). Em seguida, foram realizadas curvas de concentração-resposta cumulativa a fenilefrina (10^{-11} a 3×10^{-4} M, Sigma), acetilcolina (10^{-12} a 10^{-4} M, Sigma) e a leptina (10^{-14} a 3×10^{-6} M, Calbiochem) em anéis de aorta de ratos controle e obeso (Figura 5A, B e C).

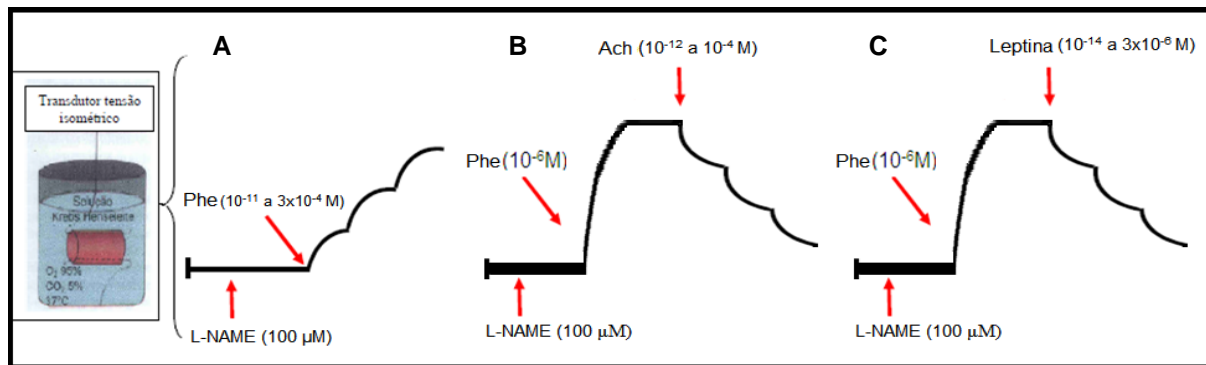


Figura 5. Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais realizados na reatividade vascular em aortas torácicas de ratos controle e obeso. **(A)** Pré-contracção com fenilefrina (Fe) seguida de relaxamento através da adição de acetilcolina (ACh); **(B)** Curvas concentração-resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh); **(C)** Curvas concentração-resposta vasodilatadora à leptina. **(A, B e C)** Curvas concentração-resposta vasoconstritora a fenilefrina (Fe), acetilcolina e leptina na ausência ou presença do bloqueador L-NAME.

3.8.4- Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros funcionais foram analisados na curva cumulativa de concentração-resposta: resposta máxima ($R_{máx}$), sensibilidade ($pD_2 = -\text{LogEC}_{50}$) e área abaixo da curva (AUC). A curva com os parâmetros avaliados está representada abaixo (Figura 6).

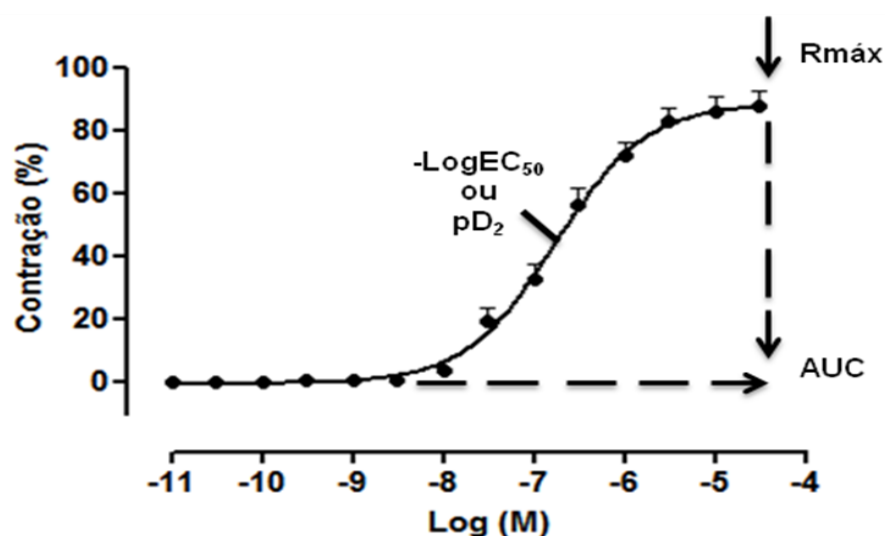


Figura 6. Representação esquemática dos parâmetros funcionais da curva de cumulativa de concentração-resposta.

3.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. As características gerais, avaliação nutricional e comorbidades foram analisadas a partir do teste *t* de *Student* para amostras independentes. A evolução do peso corporal e o perfil glicêmico foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas e complementada pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni* quando necessário.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$), sensibilidade (pD_2) e a diferença da área abaixo da curva (dAUC) em resposta aos diferentes agonistas foi realizada análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se *Graph Prism Software* (San Diego, CA, USA). Os dados de reatividade vascular foram analisados por meio do teste *t* de *Student* e/ou ANOVA de duas vias, complementada pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*. O nível de significância adotado foi de 5%.

4- RESULTADOS

4.1- COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E OBESO

Após a 27ª semana de tratamento, com a finalidade de caracterizar os grupos experimentais como verdadeiramente controles e obesos, foi aplicado o critério de separação, utilizando-se o índice de adiposidade, conforme descrito no item 3.6. Dessa forma, permaneceram no estudo nove animais controle (C; n=9) e sete obesos (Ob; n=7).

4.2- CARACTERIZAÇÃO DO INÍCIO DA OBESIDADE

A Figura 7 mostra a evolução semanal do peso corporal dos ratos C e Ob. Os animais apresentaram desenvolvimento ponderal semelhante até a 9ª semana de tratamento, no entanto, a partir da 10ª semana de tratamento houve aumento significativo do peso corporal do grupo Ob em relação ao grupo C. Essa diferença foi mantida até o final do protocolo experimental.

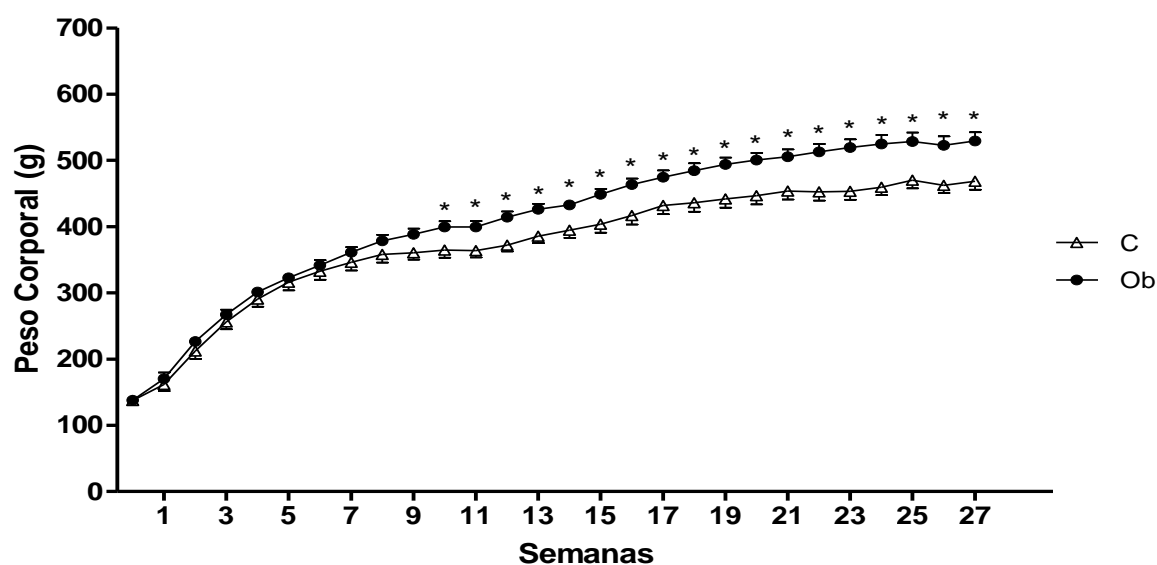


Figura 7. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (C, n= 9) e obeso (Ob, n= 7). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para modelo de medidas repetidas em dois grupos independentes, complementada com teste de comparação múltiplas de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ Ob vs C.

A Tabela 1 mostra as características gerais dos animais C e Ob. O peso corporal final, o ganho de peso corporal, os depósitos de gordura visceral, retroperitoneal e epididimal, gordura corporal total e o índice de adiposidade no Ob foram significativamente maiores do que o grupo C. Não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais para a variável pressão arterial sistólica.

Tabela 1. Características gerais

VARIÁVEIS	GRUPOS	
	C (n=9)	Ob (n=7)
PCI (g)	137 ± 10	136 ± 12
PCF (g)	468 ± 38	528 ± 35*
Ganho de peso (g)	331 ± 31	392 ± 30*
Visceral (g)	5,1 ± 1,1	10,1 ± 4,6*
Retroperitoneal (g)	10,8 ± 3,7	19,1 ± 5,4*
Epididimal (g)	6,1 ± 1,4	9,8 ± 2,5*
Gordura corporal total (g)	22 ± 6	39 ± 12*
Índice de adiposidade (%)	4,7 ± 0,9	7,4 ± 2,0*
PAS (mmHg)	122 ± 14	128 ± 16

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; PAS: pressão arterial sistólica. Teste “t” de *Student* para amostras independentes. *p<0,05 Ob vs C.

4.3- PERFIL NUTRICIONAL

A Tabela 2 ilustra as características nutricionais dos grupos experimentais. Os animais C e Ob não apresentaram diferença estatística na ingestão e eficiência alimentar. No entanto, o consumo calórico diário dos animais Ob foi significativamente maior do que o grupo C.

Tabela 2. Características nutricionais

VARIÁVEIS	GRUPOS	
	C (n=9)	Ob (n=7)
IA (g/dia)	20,8 ± 2,2	19,8 ± 1,9
IC (g x kcal/dia)	62,3 ± 6,5	72,2 ± 7,2*
EA (g/kcal)	2,82 ± 0,16	2,88 ± 0,15

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; IA: ingestão alimentar; IC: ingestão calórica; EA: eficiência alimentar. Teste “t” de *Student* para amostras independentes. *p<0,05 Ob vs C.

4.4- COMORBIDADES

As Figuras 8A e 8B ilustram os resultados do teste de tolerância à glicose realizado nos animais C e Ob. Os níveis glicêmicos nos momentos basal, 15', 30', 60' e 120' minutos foram similares entre os grupos. No entanto, a glicemia foi significativamente maior no grupo Ob quando comparado ao grupo C apenas no momento 90' minutos (Figura 8A). Contudo, a área glicêmica foi semelhante entre os grupos C e Ob (Figura 8B).

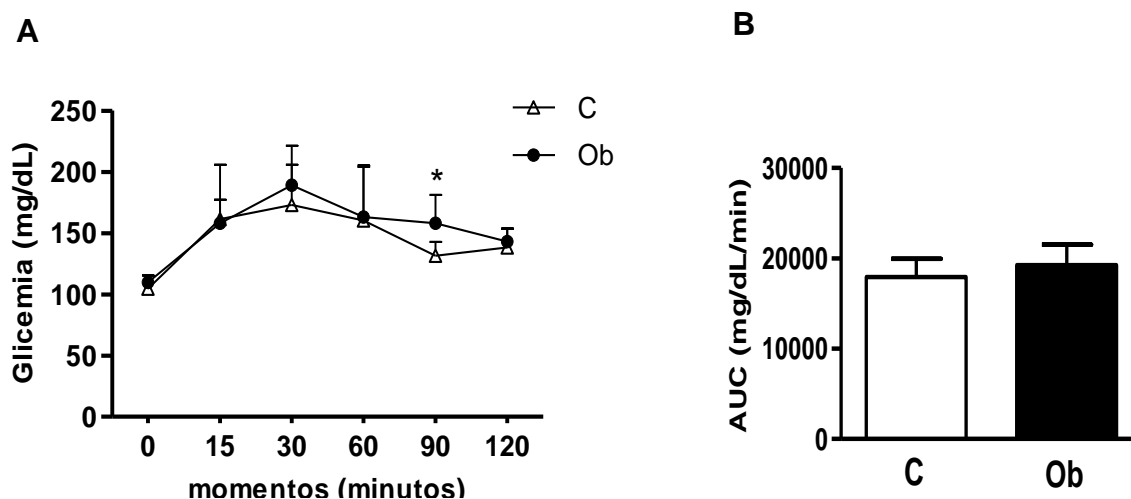


Figura 8. Dados expressos em média \pm desvio padrão. **(A)** Perfil glicêmico após o teste de tolerância à glicose dos animais controle (C; n=9) e obeso (Ob; n=7). Análise de variância (ANOVA) duas vias para modelo de medidas repetidas em dois grupos independentes, complementada com teste de comparação múltiplas de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ Ob vs C. **(B)** Área sobre a curva glicêmica. Teste “*t*” de *Student* para amostras independentes.

A Tabela 3 apresenta os resultados bioquímicos a partir da análise de triglicérides (TG), colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e proteína. Não foram observadas diferenças significativas para os níveis de TG, colesterol, HDL, LDL e proteína entre os grupos.

Tabela 3. Análise bioquímica

VARIÁVEIS	GRUPOS	
	C (n=9)	Ob (n=7)
Triglicérides (mg/dL)	75,7 ± 19,2	75,7 ± 26,4
Colesterol (mg/dL)	78,1 ± 18,2	67,9 ± 11,8
HDL (mg/dL)	19,50 ± 5,30	20,67 ± 4,32
LDL (mg/dL)	11,06 ± 4,32	11,25 ± 2,28
Proteína (g/dL)	5,36 ± 1,03	5,40 ± 0,75

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso. HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. Teste "t" de *Student* para amostras independentes.

4.5- ESTRUTURA DO CORAÇÃO *POST MORTEM*

A Tabela 4 mostra a estrutura cardíaca macroscópica *post mortem* dos ratos C e Ob. Após 27 semanas de tratamento, não foram constatadas diferenças significativas no comprimento da tíbia, nos pesos do coração, VE, VD e AT. Além disso, os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos quando o coração e as câmaras cardíacas foram normalizados pelo comprimento da tíbia.

Tabela 4. Características morfológicas cardíacas

VARIÁVEIS	GRUPOS	
	C (n=9)	Ob (n=7)
Coração (g)	1,06 ± 0,08	1,12 ± 0,09
VE (g)	0,77 ± 0,09	0,82 ± 0,06
VD (g)	0,20 ± 0,04	0,22 ± 0,03
AT (g)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,02
Tíbia (cm)	4,21 ± 0,15	4,19 ± 0,11
Coração/Tíbia (g/cm)	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,02
VE/Tíbia (g/cm)	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01
VD/Tíbia (g/cm)	0,049 ± 0,010	0,052 ± 0,006
AT/Tíbia (g/cm)	0,021 ± 0,003	0,020 ± 0,004

Dados expressos em média ± desvio padrão. VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pela tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pela tíbia; AT/tíbia: relação do peso do átrio pela tíbia. Teste “t” de *Student* para amostras independentes.

4.6- TEOR DE ÁGUA NOS TECIDOS CARDÍACO, PULMONAR E HEPÁTICO

A Tabela 5 mostra o teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos ratos C e Ob. Os resultados mostram diminuição significativa na porcentagem de umidade no fígado do grupo Ob em relação ao grupo C. Porém, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de água no VE, VD, AT e pulmão.

Tabela 5. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

VARIÁVEIS	GRUPOS	
	C (n=9)	Ob (n=7)
VE (%)	75,7 ± 0,9	74,8 ± 0,7
VD (%)	76,3 ± 1,5	75,3 ± 1,6
AT (%)	78,0 ± 4,2	74,7 ± 6,4
Pulmão (%)	78,9 ± 1,0	77,8 ± 1,7
Fígado (%)	66,2 ± 1,8	62,3 ± 4,2*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Teste "t" de *Student* para amostras independentes. * p<0,05 Ob vs C.

4.7- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR *IN VITRO*

4.7.1- Avaliação do efeito da obesidade sobre a reatividade vascular nos anéis isolados de aorta e a produção de óxido nítrico

As Figuras 9 e 10A-C ilustram os efeitos da obesidade sobre a resposta contrátil à fenilefrina na ausência e presença do bloqueador L-NAME (bloqueador inespecífico da enzima NO sintase). Os animais Ob apresentaram resposta máxima significativamente diminuída ($R_{\text{máx}}$: C: $88,5 \pm 4,8\%$ vs Ob: $61,1 \pm 5,4\%^*$; $*p < 0,05$; Figura 10A) e aumento significativo da sensibilidade (pD_2 : C: $-6,78 \pm 0,10$ vs Ob: $-7,31 \pm 0,12^*$; $*p < 0,05$; Figura 10B) em relação ao grupo C, respectivamente. Após o bloqueio com o L-NAME não houve diferença significativa entre a $R_{\text{máx}}$ dos animais C quando comparada aos animais Ob (C: $147,2 \pm 6,1\%$ vs Ob: $138,9 \pm 6,5\%$; Figura 10A). No entanto, na pD_2 houve aumento significativo entre os animais Ob em relação ao C (pD_2 : C: $-7,41 \pm 0,13$ vs Ob: $-7,80 \pm 0,10^*$; $*p < 0,05$; Figura 10B).

Na Figura 10C não foi observado diferença significativa entre os grupos estudados na diferença da área abaixo da curva (dAUC) em resposta à concentração-resposta à fenilefrina na ausência e presença do L-NAME (C: $218,43 \pm 12,34\%$ vs Ob: $246,41 \pm 32,12\%$; $p > 0,05$).

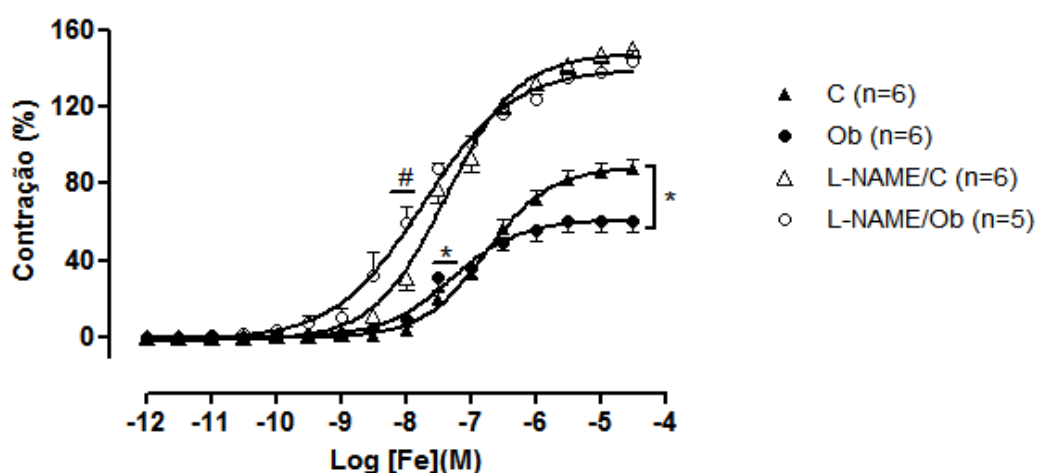


Figura 9. Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e obeso (Ob) na presença ou ausência de L-NAME. Dados expressos em média \pm erro padrão. Análise de variância (ANOVA) de dois fatores com teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ Ob vs C. # $p < 0,05$ L-NAME/Ob vs L-NAME/C.

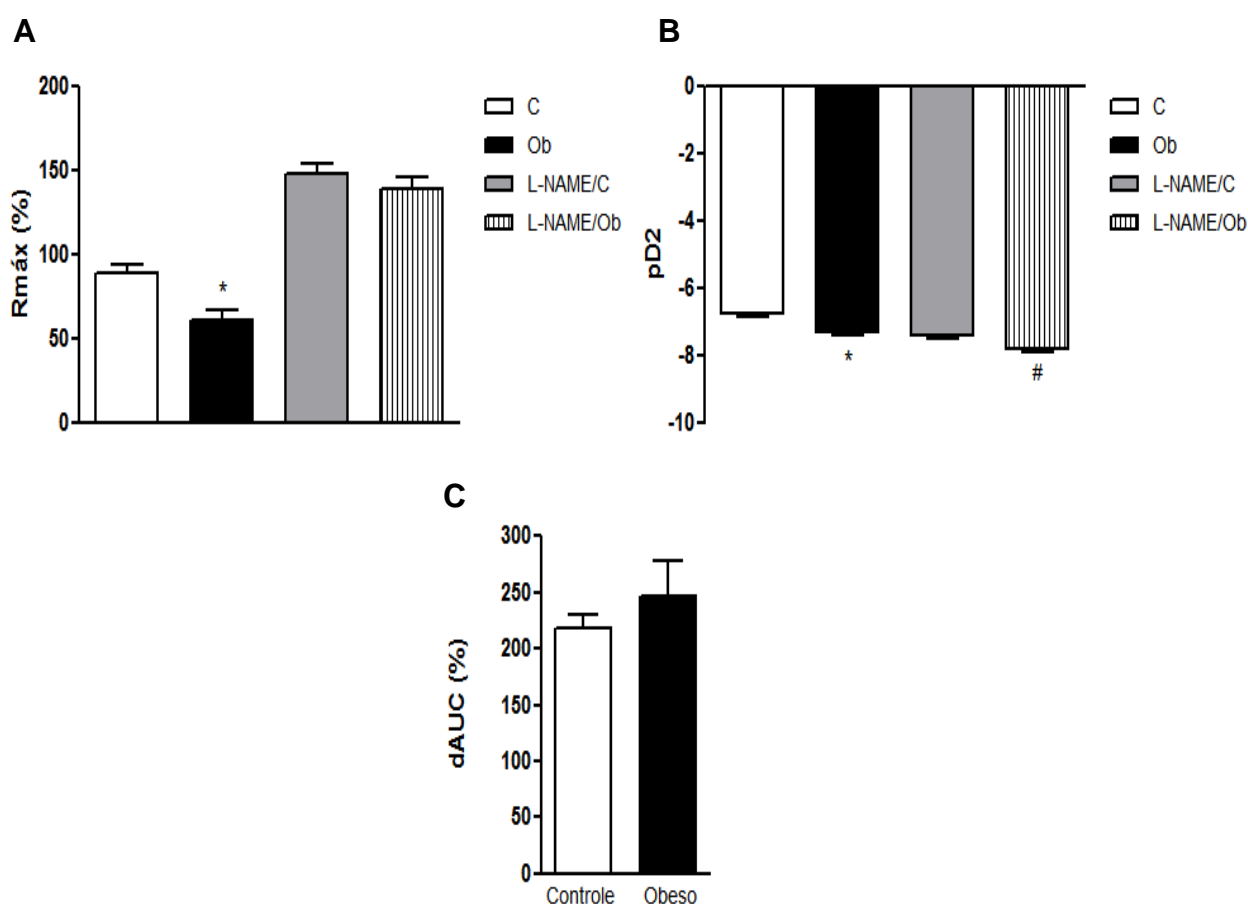


Figura 10. (A) Resposta máxima (Rmáx), (B) Sensibilidade (pD_2) e (C) Diferença da área abaixo da curva (dAUC) da curva de concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e obeso (Ob) na presença ou ausência de L-NAME. Dados expressos em média \pm erro padrão. A e B: Análise de variância (ANOVA) de dois fatores com teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. C: Teste *t* de *Student*. $p < 0,05$ Ob vs C. # $p < 0,05$ L-NAME/Ob vs L-NAME/C.

4.7.2- Participação do óxido nítrico na modulação da resposta vasodilatadora à acetilcolina

As Figuras 11 e 12A-C apresentam os resultados do relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de ratos, avaliados por meio da curva de concentração-resposta. Os resultados mostram que não foram observadas diferenças significativas na $R_{\text{máx}}$ (C: $93,7 \pm 3,1\%$ vs Ob: $94,3 \pm 3,5\%$) e na pD_2 (C: $-8,87 \pm 0,47$ vs Ob: $-8,53 \pm 0,72$; Figuras 11 e 12A e B).

Após o bloqueio com L-NAME, os anéis de aorta do grupo Ob apresentaram diminuição significativa na $R_{\text{máx}}$ (L-NAME/Ob: $4,10 \pm 1,89\%$ vs L-NAME/C: $26,54 \pm 5,30\%$; $p < 0,05$) em relação ao C (Figura 11 e 12A). No entanto, os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos na pD_2 (L-NAME/C: $-8,19 \pm 1,34$ vs L-NAME/Ob: $-7,53 \pm 0,59$; Figura 10B). Na Figura 12C não foi observado diferença significativa entre os grupos estudados na diferença da área abaixo da curva (dAUC) em resposta à acetilcolina na ausência e presença do L-NAME (C: $358,55 \pm 39,14\%$ vs Ob: $394,34 \pm 41,77\%$).

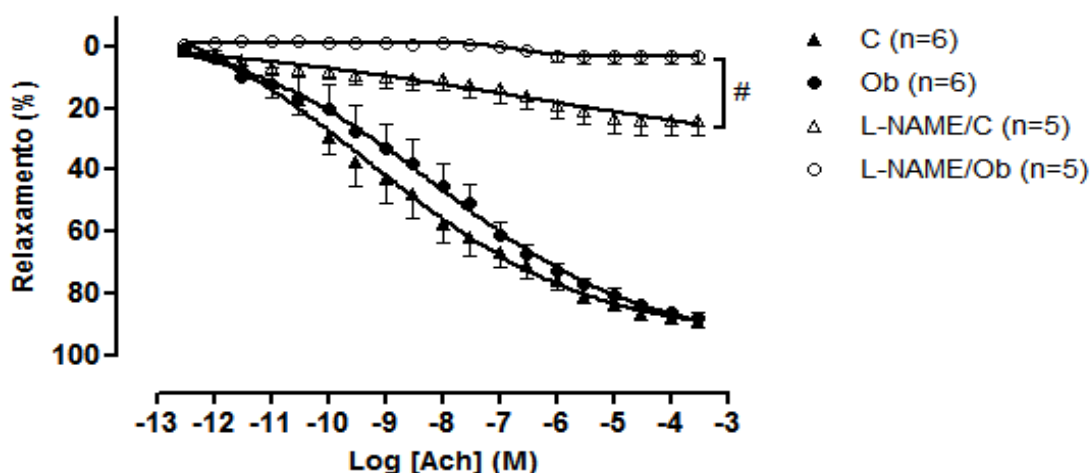


Figura 11. Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e obeso (Ob) na presença ou ausência de L-NAME. Dados expressos em média \pm erro padrão. Análise de variância (ANOVA) de dois fatores com teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. # $p < 0,05$ L-NAME/Ob vs L-NAME/C.

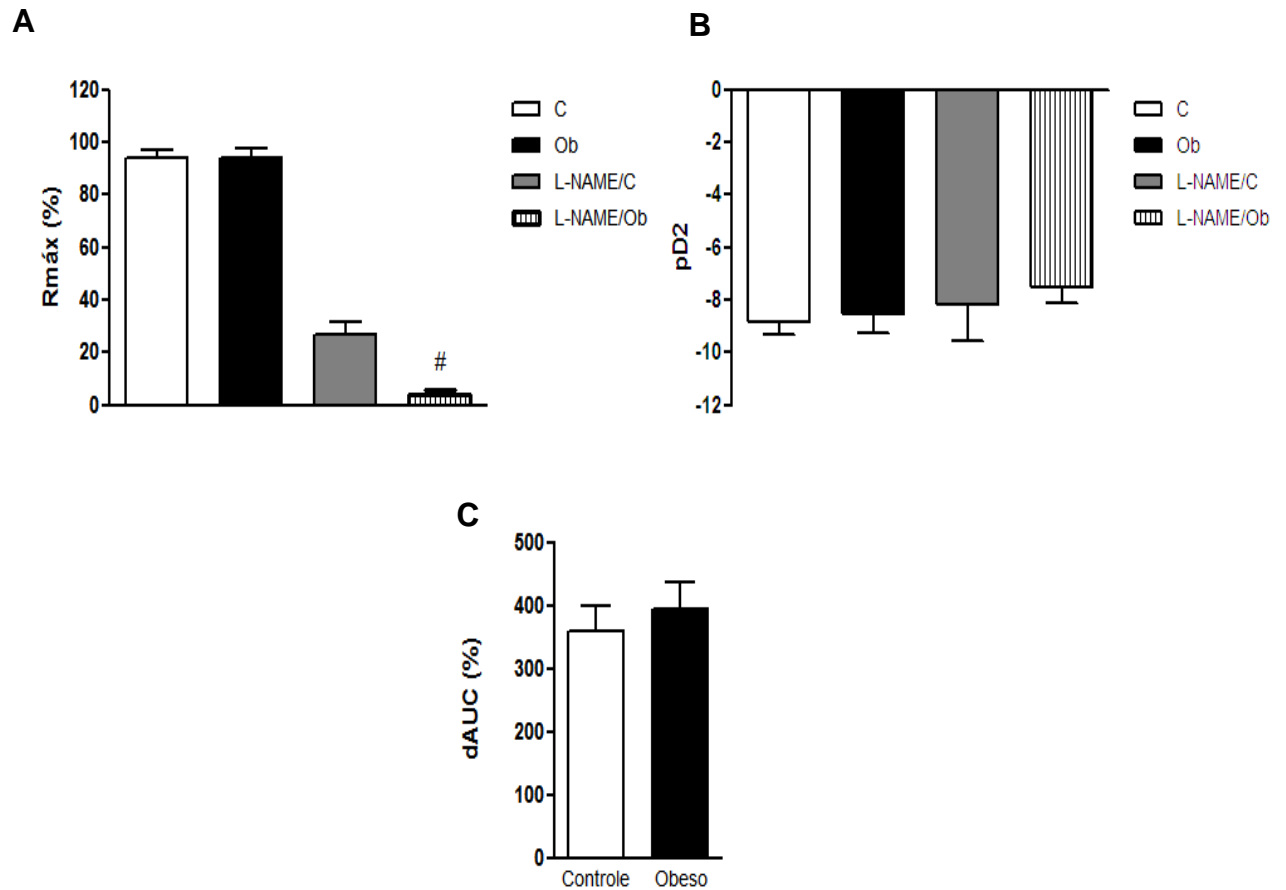


Figura 12. (A) Resposta máxima (Rmáx), **(B)** Sensibilidade (pD₂) e **(C)** Diferença da área abaixo da curva (dAUC) da curva de concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e obeso (Ob) na presença ou ausência de L-NAME. Dados expressos em média \pm erro padrão. A e B: Análise de variância (ANOVA) de dois fatores com teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. C: Teste *t* de *Student*. [#]p<0,05 L-NAME/Ob vs L-NAME/C.

4.7.3- Relaxamento induzido pela leptina e a participação do óxido nítrico na modulação da resposta vasodilatadora

A Figura 13 ilustra a curva de concentração-resposta à leptina na ausência ou presença de L-NAME nos grupos C e Ob. Os resultados mostram que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na $R_{\text{máx}}$ (C: $47,8 \pm 3,1\%$ vs Ob: $42,9 \pm 10,5\%$, $p > 0,05$) e pD_2 (C: $-9,93 \pm 0,36$ vs Ob: $-9,48 \pm 0,59$), respectivamente (Figura 14A e B).

Após a incubação dos anéis de aorta com o L-NAME, os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos C e Ob na $R_{\text{máx}}$ ($7,8 \pm 3,8\%$ vs $1,5 \pm 1,3\%$; Figura 14A) e na pD_2 ($-12,54 \pm 1,79$ vs $-8,90 \pm 1,32$; Figura 14B). Na Figura 14C não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados na diferença da área abaixo da curva (dAUC) em resposta à leptina na ausência e presença do L-NAME (C: $182,76 \pm 15,30\%$ vs Ob: $189,19 \pm 53,23\%$).

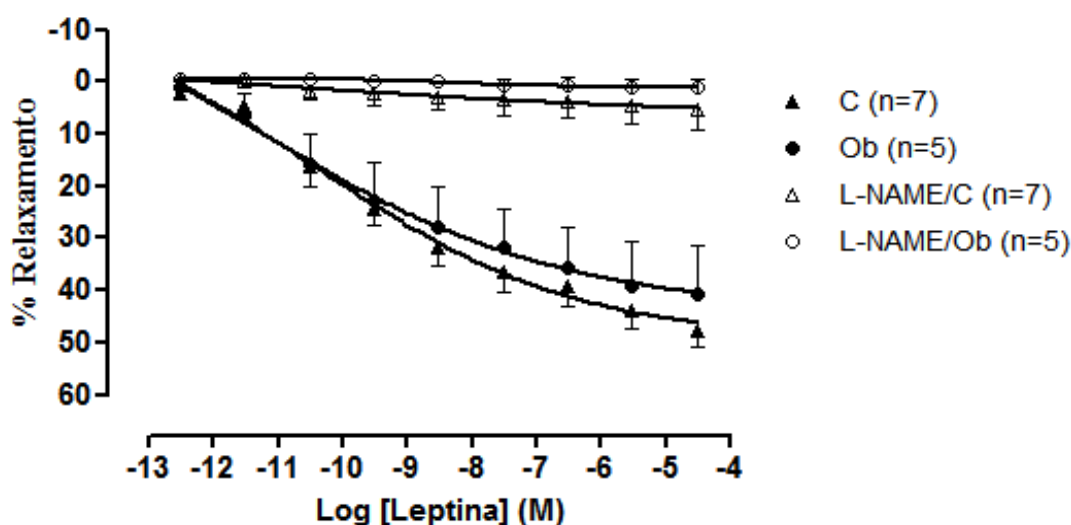


Figura 13. Curva concentração-resposta à leptina em anéis de aorta torácica de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e obeso (Ob) na presença ou ausência de L-NAME. Dados expressos em média \pm erro padrão. Análise de variância (ANOVA) de dois fatores com teste de comparação múltipla de Bonferroni.

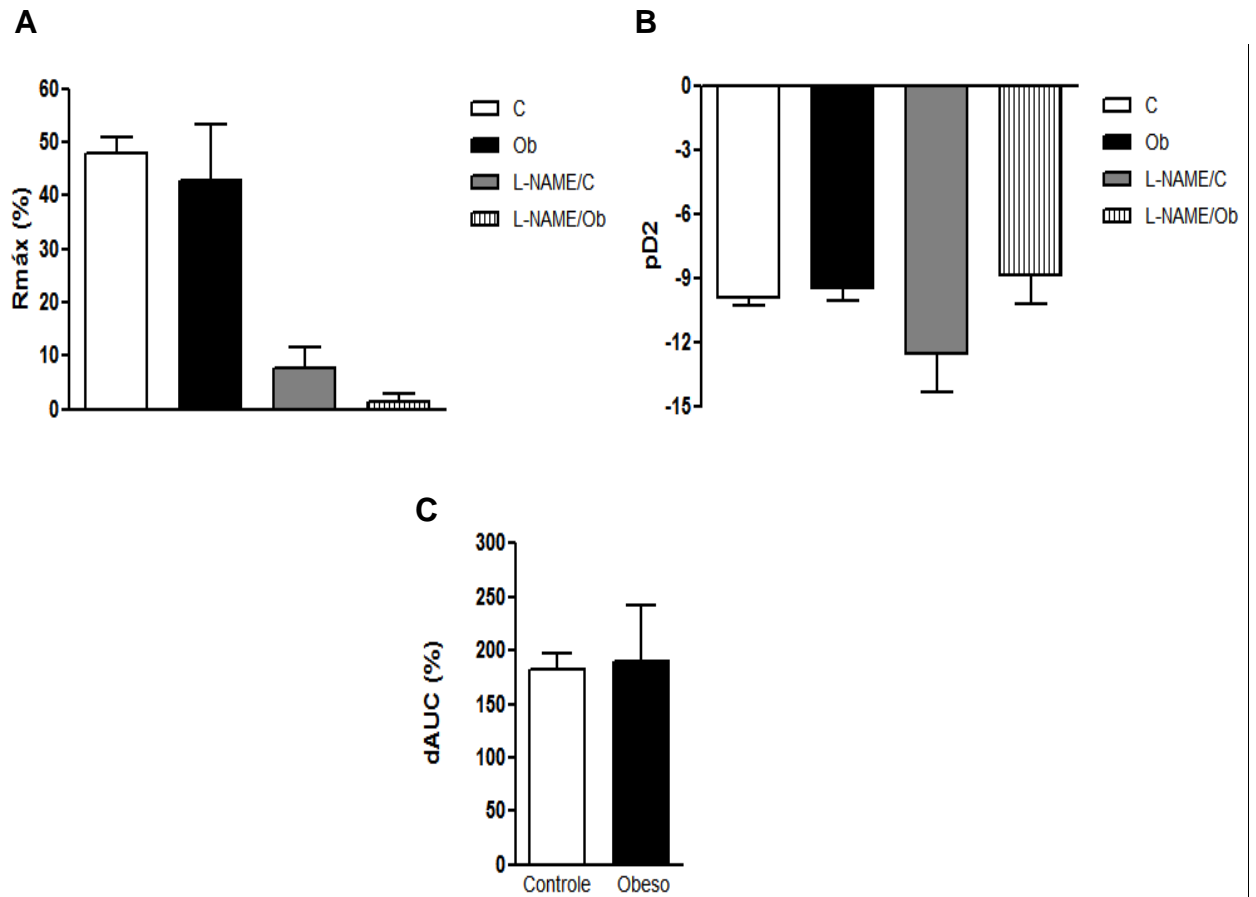


Figura 14. (A) Resposta máxima (Rmáx), **(B)** Sensibilidade (pD₂) e **(C)** Diferença da área abaixo da curva (dAUC) da curva de concentração-resposta à leptina em anéis de aorta torácica de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e obeso (Ob) na presença ou ausência de L-NAME. Dados expressos em média \pm erro padrão. A e B: Análise de variância (ANOVA) de dois fatores com teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. C: Teste *t* de *Student*.

5- DISCUSSÃO

O comportamento moderno da sociedade industrializada caracteriza-se pelo sedentarismo e alterações nos hábitos alimentares, decorrentes de mudanças sociais, econômicas, demográficas, tecnológicas e culturais, as quais afetam diretamente o estilo de vida da população⁽⁵⁰⁾. Essas mudanças revelaram a adoção de um padrão dietético com elevados teores de carboidratos e gorduras, os quais estão associados com aumento do tecido adiposo e favorecem o aparecimento de comorbidades como dislipidemias, resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares⁽⁵¹⁾.

Diversos estudos têm demonstrado que modelos experimentais representam uma ferramenta importante para a compreensão dos mecanismos metabólicos e fisiológicos envolvidos na obesidade⁽⁵²⁾. Em roedores têm sido muito utilizado a indução de obesidade por meio de dietas compostas de alimentos densamente calóricos, ricos em açúcares, carboidratos e gorduras, porém pobres em vitaminas e minerais; esse instrumento é utilizado com intuito de reproduzir o comportamento nutricional humano^(18,53). Dentro desse contexto, os resultados mostram que a dieta hiperlipídica insaturada utilizada no presente estudo acarretou maior ingestão calórica, elevação do peso e a gordura corporal, índice de adiposidade, caracterizando um modelo reprodutível de obesidade. Após a aplicação do critério de classificação a partir do índice de adiposidade, para a constituição dos grupos de maneira homogênea, o descarte dos animais pela ausência de adesão ao critério estabelecido foi de 35,7% e 50% nos grupos controle e obeso, respectivamente. Nascimento et al.⁽⁵⁴⁾ ao compor os grupos controle e obeso, utilizou critério similar de separação a partir da gordura corporal na carcaça, sendo descartados menos de

20% dos animais nos respectivos grupos, incidindo em perdas menores do que as encontradas neste trabalho.

5.1- PERFIL NUTRICIONAL

Os animais submetidos à obesidade por dieta hiperlipídica, rica em ácidos graxos insaturados, apresentaram aumento significativo no peso corporal a partir da 10ª semana de tratamento, sendo esse resultado mantido até a 27ª semana do protocolo de indução a obesidade. Os nossos achados são contrários à literatura que mostram diferença no peso corporal a partir da 3ª e 5ª semana de tratamento com dieta hiperlipídica^(54,55,56,57).

Entretanto, alguns estudos mostram que o peso corporal não é bom indicador de classificação de obesidade em animais^(54,58). Tal fato pode ser constatado neste trabalho, uma vez que enquanto a gordura corporal e o índice de adiposidade aumentaram 77,3% e 57,4%, respectivamente, o ganho de peso corporal elevou somente 18,4%. Dessa forma, alguns autores sugerem que o peso corporal não representa um parâmetro fidedigno de avaliação para obesidade, desde que é ineficaz em relação à quantidade de gordura corpórea. Portanto, recomenda-se utilizar outras variáveis de mensuração para identificar obesidade, por exemplo, a gordura corporal total^(54,58). Estudos mostram que dietas hiperlipídicas contendo $\geq 30\%$ da energia total de gordura favorece o desenvolvimento da obesidade, demonstrando relação positiva entre os níveis de gordura na dieta e o aumento nos depósitos de tecido adiposo⁽⁵⁹⁾. Nesse estudo, os ratos do grupo Ob apresentaram aumento significativo dos depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e epididimal

decorrente do consumo da dieta hiperlipídica. Esses dados são compatíveis com vários autores, mostrando que a dieta hiperlipídica acarreta obesidade^(55,57,60,61).

Os mecanismos responsáveis pela hiperfagia em humanos e roedores submetidos às dietas hiperlipídicas ainda não estão claros, mas são atribuídos a propriedades organolépticas, como alta palatabilidade relacionada às propriedades sensoriais das dietas ricas em gorduras⁽⁶²⁾. Embora dietas com alto teor de gordura estejam associadas à hiperfagia, o consumo alimentar (g) diário de ração não diferiu entre os grupos C e Ob, indicando ausência de hiperfagia. Esses achados corroboram com Keita et al.,⁽⁵⁶⁾ demonstrando que ratos alimentados com dietas de azeite extra virgem e de margarina desenvolveram obesidade, mesmo ingerindo menos alimentos do que o grupo controle. Os autores ressaltam que a obesidade observada nos animais depende da quantidade de gordura total ingerida, composição e duração do tratamento dietético. Apesar dos animais C e Ob não apresentarem diferença no consumo e na eficiência alimentar, o maior ganho de gordura corporal exibido pelo grupo Ob ocorreu devido à diferença calórica das rações. Essa diferença está relacionada ao elevado valor energético da dieta hiperlipídica de 3,65 Kcal/g comparada à ração padrão 2,99 Kcal/g, gerando uma diferença de 22% no conteúdo calórico, a qual é suficiente em induzir obesidade. Desta forma, pesquisadores relatam que é possível desenvolver obesidade sem aumento da ingestão alimentar, desde que haja mudanças na composição de macronutrientes e, conseqüentemente, aumento da ingestão de calorias consumidas, o qual resultará no acúmulo de tecido adiposo^(63,60). A obesidade não é causada apenas pela qualidade nutricional da dieta, do consumo total de calorias ou da quantidade de alimentos ingeridos, mas sim pela interação entre os alimentos

ingeridos e os fatores relacionados ao estilo de vida como, por exemplo, o sedentarismo⁽⁶⁴⁾.

5.2- COMORBIDADES

A obesidade é frequentemente associada a um conjunto de distúrbios metabólicos e endócrinos como intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, dislipidemias e hipertensão arterial. No entanto, o modelo de obesidade não foi capaz de evidenciar alterações na glicemia, dislipidemia e pressão arterial sistólica.

O teste de tolerância à glicose mostrou que, após sobrecarga de glicose, os animais C e Ob não apresentaram diferença na curva e na área glicêmica. Entretanto, estes resultados divergem dos estudos anteriores desenvolvidos em nosso grupo que mostram que animais submetidos à obesidade com dieta hiperlipídica por 15 e 30 semanas, apresentam intolerância à glicose, aumento nos níveis séricos de insulina e resistência à insulina^(65,19,66). Sendo assim, embora não tenham sido mensurados os níveis de insulina no presente estudo, sugere-se que os animais obesos apresentaram hiperinsulinemia sem resistência à ação da insulina, uma vez que a insulina foi efetiva na manutenção da glicemia.

A dislipidemia observada na obesidade é caracterizada pelos níveis elevados de triglicérides (TG), colesterol, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuição dos níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL)^(67,68). No entanto, como relatado anteriormente não houve prejuízo no perfil lipídico, corroborando com vários autores^(66,34) e divergindo quanto aos achados que encontraram elevação do

TG^(61,57). Pesquisas têm demonstrado que a utilização de ratos *Wistar* e camundongo para estudar as alterações no perfil lipídico e, consequente, dislipidemia, parece não representar modelos ideais e fidedignos, pois são resistentes ao desenvolvimento de dislipidemia e aterosclerose⁽⁶⁹⁾. Os autores inferem que o metabolismo lipídico dos ratos e camundongos está relacionado aos níveis de HDL, ao invés do LDL como é observado em humanos, o que possivelmente contribui para a resistência aterogênica⁽⁶⁹⁾. Além disso, é importante ressaltar que a composição lipídica das rações dos animais obesos utilizadas neste estudo é de ácidos graxos insaturados. A literatura mostra que essas dietas são potenciais redutores do teor sérico de colesterol, por aumentar a captação hepática de colesterol⁽⁷⁰⁾, enquanto a gordura saturada está associada com aumento de colesterol total e LDL e redução do HDL⁽⁷¹⁾.

Em relação ao comportamento cardiovascular, a pressão arterial sistólica (PAS) manteve-se inalterada nos animais C e Ob. Este resultado diverge de trabalhos que mostram elevação na pressão arterial sistólica^(72,73,65). Diversos mecanismos são responsáveis pelo aumento da pressão arterial, entre eles, destacam-se agentes adrenérgicos, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, sistema renina angiotensina (SRA) e sistema nervoso simpático, os quais podem desencadear vasoconstrição periférica e, consequentemente, hipertensão arterial⁽⁷⁴⁾. Entretanto, outros estudos revelaram ausência de alterações da PAS em animais obesos^(34,67,75,76,55). Alguns achados têm mostrado que a dieta hiperlipídica insaturada está relacionada com a produção de óxido nítrico endotelial estimulado pela insulina e leptina^(19,20). Assim, a hiperinsulinemia e hiperleptinemia, observada nos animais submetidos à obesidade por dieta hiperlipídica, podem ser responsáveis

pelo aumento da produção e liberação de óxido nítrico, o que resultaria em redução da resistência periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial^(19,20).

5.3- ESTRUTURA DO CORAÇÃO *POST MORTEM*

O estudo morfológico *post mortem* do coração, a partir da análise dos pesos isolados das câmaras cardíacas, mostra que a obesidade não acarretou hipertrofia cardíaca. No entanto, quando o coração é normalizado pela tíbia, os animais Ob mostram razão maior no grupo Ob ($p=0,09$), no entanto, não significativa. Estes dados divergem de estudos que indicam que a obesidade induzida por dieta rica em gordura acarreta hipertrofia cardíaca^(57,76).

A hipertrofia do miócito consiste em um mecanismo de adaptação em resposta a diversos estímulos, tais como, aumento do débito cardíaco decorrente da necessidade metabólica imposta, por exemplo, pela obesidade^(77,78). Esse processo inclui aumento do volume sanguíneo circulante e resistência vascular sistêmica, os quais contribuem para um maior trabalho cardíaco^(79,80). Embora este trabalho não tenha mostrado que a obesidade acarrete remodelação cardíaca, os achados da razão coração/tíbia sugerem que a obesidade causou hipertrofia cardíaca de magnitude mais fisiológica do que patológica. Esses dados corroboram com Campos et al.⁽⁶⁶⁾ que demonstram que ratos *Wistar* alimentados por 30 semanas com dieta hipercalórica não apresentam hipertrofia cardíaca; no entanto, divergem de alguns autores que mostram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica resulta em hipertrofia cardíaca^(81,82). Enquanto alguns trabalhos têm relatado hipertrofia cardíaca em jovens camundongos *ob/ob* e *db/db*, outras pesquisas têm mostrado

somente remodelação cardíaca em animais que sofrem influência do envelhecimento^(83,84,85). Esses achados são semelhantes aos observados por Carroll et al.⁽³⁴⁾ e Ricci et al.⁽⁸⁶⁾ que, ao induzir ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* à obesidade com dieta hiperlipídica por 12 e 14 semanas, não mostram hipertrofia cardíaca.

Embora muito se especule sobre indução da obesidade por dieta hiperlipídicas e suas consequências no coração. Os estudos mostram que em ratos *Wistar*, submetidos à dieta com elevado teor de gordura insaturada acarreta redução da quantidade de ceramida cardíaca em comparação à dieta rica com gordura saturada, sugerindo frequência reduzida de apoptose nos cardiomiócitos^(87,88,89). Além disso, a suplementação dietética com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), têm indicado melhora na eficiência cardíaca^(90,91) e atenuação da hipertrofia ventricular esquerda⁽⁹²⁾.

5.4- REATIVIDADE VASCULAR

As doenças vasculares constituem as principais causas de morbidade em indivíduos obesos⁽⁹³⁾ incluindo diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO)^(94,95), bem como elevação de componentes envolvidos na contração, tais como, angiotensina e endotelina que induzem a contração do músculo liso vascular^(96,97). O presente estudo analisou o efeito da indução à obesidade por meio de dieta hiperlipídica sobre a resposta vascular em artéria de condutância (aorta) de ratos, bem como a participação do receptor de leptina.

O mecanismo de contração vascular resultante da interação do agonista fenilefrina (Fe) com o receptor α_1 -adrenérgico expresso no músculo liso vascular foi

avaliado por meio de curvas cumulativas à Fe, ao qual foi observado o efeito da dieta hiperlipídica sobre o mecanismo de ação intracelular. O receptor α_1 está acoplado a proteína $G_q^{(98)}$, a qual ativa a fosfolipase C (PLC) que hidrolisa a fosfatidilinositol bifostato (PIP_2), resultando em trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 atua em receptores específicos no retículo sarcoplasmático, enquanto a DAG ativa a proteína quinase C (PKC), elevando a mobilização de cálcio (Ca^{+2}) no meio intracelular, por meio de canais de Ca^{+2} sensíveis à voltagem do tipo L^(98,99). No músculo liso vascular o aumento na concentração de Ca^{+2} intracelular ativa a quinase de cadeia leve da miosina e a fosforilação da miosina; uma vez fosforilada a miosina interage com filamentos de actina, produzindo contração na célula muscular lisa⁽¹⁰⁰⁾. Os resultados do presente estudo mostram que a obesidade promoveu diminuição na resposta contrátil à Fe, sugerindo que o endotélio estaria liberando um fator de relaxamento.

Os achados estão em concordância com Nascimento et al.⁽²⁰⁾ ao utilizarem modelo semelhante de indução à obesidade com dieta hiperlipídica insaturada, por 15 semanas, demonstraram redução da resposta máxima à noradrenalina em anéis de aorta de ratos *Wistar*. Em outro experimento Nascimento et al.⁽¹⁹⁾ ao submeterem os animais à obesidade por 30 semanas, não apresentaram diferença na resposta vasoconstritora à noradrenalina, sugerindo que o tempo de exposição à obesidade altera a resposta vasoconstritora. Por outro lado Keita et al.⁽⁵⁶⁾ e Bautista et al.⁽¹⁰¹⁾, ao avaliarem a reatividade vascular em anéis de aortas de ratos *Wistar* submetidos à obesidade por dietas hiperlipídicas insaturada (azeite extravirgem; óleo de canola) e saturada (margarina; óleo de canola frito), por 20 e 10 semanas, respectivamente, demonstraram que a obesidade não acarreta diferença na resposta vasoconstritora à fenilefrina. A ausência de alterações na resposta vasoconstritora pode estar

relacionada, provavelmente, à quantidade e a natureza de lipídios na dieta, os quais são considerados fatores protetores e/ou desencadeadores de aterosclerose e estão associados à redução da atividade de óxido nítrico (NO)⁽⁷¹⁾.

Dentre os fatores relaxantes liberados pelo endotélio vascular e que podem contribuir com a diminuição da resposta contrátil encontrada neste estudo, destaca-se o óxido nítrico (NO), uma substância vasodilatadora que modula a resposta de diferentes agonistas. O NO é um radical livre, lipossolúvel, sintetizado por uma família de enzimas denominadas NO sintases (NOS) a partir da oxidação de um nitrogênio guanidino terminal do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO⁽²³⁾. Dentro desse contexto, três isoformas de NOS foram identificadas; sendo uma expressa como induzível (iNOS), localizada em macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e independente de Ca^{+2} . As duas outras isoformas são constitutivas, isto é, dependentes de íons Ca^{+2} , na qual temos a NOS neural (nNOS) presente em neurônios e a NOS endotelial (eNOS; *endothelial nitric oxide synthase*) encontrada em plaquetas e, principalmente, nas células endoteliais vasculares^(102,103). O NO derivado do endotélio apresenta função vasodilatadora, exerce potente efeito antiaterogênico e trombo resistente, inibe a agregação plaquetária, a adesão de monócitos e leucócitos e a proliferação celular⁽¹⁰³⁾.

Na tentativa de elucidar a participação e o aumento da biodisponibilidade do NO na diminuição da resposta contrátil à Fe, foi realizada curva concentração resposta na presença de L-NAME. Esse fármaco inibe a óxido nítrico sintase (NOS), impedindo a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) na célula muscular e, conseqüentemente, a síntese e liberação de NO⁽¹⁰⁴⁾. Após inibição da síntese de NO, a obesidade não alterou a biodisponibilidade de NO. Corroborando aos achados do presente estudo, Nascimento et al.⁽²⁰⁾ demonstraram que a

hiporreatividade à noradrenalina em anéis de aorta de ratos *Wistar* induzidos a obesidade por 15 semanas, não foi mais visualizada após inibição da síntese de NO com L-NAME, indicando importante participação do NO na modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina mediada pelo endotélio. Os mesmos pesquisadores⁽¹⁹⁾ utilizando modelo experimental similar, no entanto, com duração de 30 semanas, observaram que o bloqueio com L-NAME produz um desvio à esquerda na resposta contrátil à noradrenalina, sendo menor nos animais obesos quando comparado ao animal controle. Além disso, o L-NAME elevou a resposta máxima à noradrenalina que foi similar entre os grupos, sugerindo que nos animais obesos há envolvimento da via L-arginina/NO é acentuada⁽¹⁹⁾.

A partir dos resultados descritos acima, no qual houve diminuição da resposta contrátil à Fe, foi investigado se a obesidade altera o relaxamento vascular dependente do endotélio, utilizando acetilcolina (ACh). A vasodilatação produzida pela ACh é decorrente da estimulação de receptores muscarínicos do subtipo M₃, localizados nas células endoteliais. A ocupação desses receptores pelo agonista estimula a fosfolipase C (PLC) e cataliza a produção fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato (PIP₂), em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃). O IP₃ libera Ca⁺² do retículo endoplasmático elevando a concentração de Ca⁺² intracelular, o qual ativa a liberação de NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO se difunde para a célula do músculo liso vascular e ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), formando monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), a partir da quebra trifosfato de guanosina (GTP). O aumento da concentração do GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que, por meio da fosforilação de diversas proteínas, promove o relaxamento do músculo liso vascular por redução da concentração intracelular de Ca²⁺⁽¹⁰⁵⁾.

Neste estudo, a obesidade não alterou a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, sugerindo que não houve alteração na produção de NO estimulada pela ACh. Corroborando a estes achados Mundy et al.⁽¹⁸⁾ mostram que a dieta hiperlipídica por 15 semanas em camundongos *C57BL/6* não altera o relaxamento dependente do endotélio à ACh. Em contrapartida outros autores encontraram resultados controversos quanto à influência da obesidade na resposta vasodilatadora. Nascimento et al.⁽²⁰⁾ apontam que ratos *Wistar* submetidos a obesidade por dieta com alto teor de gordura por 15 semanas, produz aumento da resposta máxima à ACh quando comparados com ratos controle. Bautista et al.⁽¹⁰¹⁾ encontraram diminuição na resposta vasodilatadora à ACh em ratos *Wistar* submetidos à obesidade por dieta a partir de óleo de canola. Os autores indicam que a resposta endotelial alterada pela ACh está associada à compostos tóxicos derivados dos ácidos graxos durante o processo de cozimento⁽¹⁰¹⁾.

A fim de avaliar o efeito da obesidade e a participação da enzima NO sintase na resposta relaxante induzida por ACh os anéis de aorta foram incubados com L-NAME. Os resultados mostram que a resposta vasodilatadora endotélio-dependente em anéis de aorta de ratos obesos, após o bloqueio com L-NAME, foi abolida, demonstrando que o relaxamento induzido pela ACh na obesidade é totalmente dependente da liberação de NO. Outros mecanismos podem ser responsáveis pelo relaxamento vascular à ACh, tais como: a prostaciclina (PGI_2) e/ou o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE)^(106,107,108).

A interação do agonista, acetilcolina, com os receptor localizado no endotélio vascular, promove aumento do influxo de Ca^{+2} intracelular a partir de três eventos de modulação do tônus vascular⁽¹⁰⁷⁾: 1) abertura dos canais de potássio (K^+) presentes no endotélio, os quais promovem efluxo desse íon na célula endotelial e,

consequente, diminuição do K^+ intracelular, os quais acarretam geração de cargas negativas na membrana celular, tornando-a hiperpolarizada. Essa condição resulta no fechamento dos canais de Ca^{2+} presentes na célula muscular e, consequentemente, relaxamento do vaso^(106,108); 2) ativação da enzima fosfolipase A_2 que catalisa a hidrólise de moléculas de fosfolípídeo de membrana e gera o ácido araquidônico (AA), oxidado pela enzima ciclooxygenase (COX), originando a prostaciclina (PGI_2). Em seu mecanismo de ação vasorrelaxante a PGI_2 nas células do músculo lisa vascular ativa receptores específicos da membrana acoplados a proteína G, entre eles, a adenilato ciclase. A ativação dessa enzima cliva o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), causando relaxamento da musculatura⁽¹⁰²⁾; 3) elevação do cálcio intracelular ativa a eNOS, a qual promove síntese de NO que se difunde para o músculo liso vascular e estimula a guanilato ciclase solúvel (GCs) converter a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), o que resulta em vasorelaxamento^(101,108). Dentro desse contexto, acredita-se que a PGI_2 e/ou FHDE, em conjunto com o NO, exibem uma inter-relação complexa, porém bem integrada regulando a homeostase vascular o que não foi observado na obesidade^(18,110). No entanto, estudos futuros são necessários para esclarecer a participação dessas vias em vasos de condutância.

Vários mediadores como insulina⁽¹¹¹⁾ e leptina⁽¹¹²⁾ são capazes de estimular a liberação de NO nas células endoteliais. Estudos têm mostrado que a concentração de leptina circulante é proporcional à quantidade de tecido adiposo⁽¹⁰⁶⁾. Apesar deste trabalho não ter analisado a concentração de leptina até o presente momento, acredita-se que os animais obesos desenvolveram hiperleptinemia; essa afirmação é baseada em trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório que utilizaram

protocolo experimental semelhante e demonstraram que a obesidade acarreta hiperleptinemia^(65,19,20,55,76,61,66,57). Assim, com o objetivo de avaliar se o receptor de leptina está envolvido na diminuição da resposta contrátil da Fe e no aumentando da biodisponibilidade de NO, realizou-se curva concentração resposta à leptina.

A ligação da leptina com o receptor de leptina (Ob-Rb) promove aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, a qual ativa a formação e liberação de NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO difunde-se para o músculo liso vascular ativando o guanilato ciclase (GCs) que converte a guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), acarretando no relaxamento da musculatura lisa⁽¹¹³⁾. Neste estudo, não foi observado modificação da resposta vasodilatadora dependente à leptina em ratos obesos, sugerindo que a obesidade não alterou a produção de NO estimulada pela leptina.

Lembo et al.⁽³⁶⁾, utilizando ratos *Kyoto* normotensos de 12 a 14 semanas, mostram que a leptina induz relaxamento em artérias de aorta e mesentéricas. Essa resposta é abolida por denudação endotelial, sugerindo que a integridade do endotélio é crítica para a ação da leptina na vasodilatação. Fruhbeck⁽¹¹⁴⁾ demonstraram que a administração aguda por via intravenosa de leptina aumenta a liberação NO endotelial em ratos *Wistar*, porém essa resposta não é visualizada em ratos *Zucker* obesos com deficiência no receptor de leptina, sugerindo que a integridade do receptor é necessário para a produção do NO. Vecchione et al.⁽¹¹²⁾ indicam que a leptina promove aumento da fosforilação de Akt induzindo a fosforilação da eNOS na serina¹¹⁷⁷ em anéis de aorta de ratos *Wistar Kyoto* com 12 a 14 semanas.

Os achados do presente estudo mostram que a obesidade não alterou a produção de NO estimulada pelo receptor de leptina, mas diminuiu a resposta

contrátil a Fe e aumentou a biodisponibilidade de NO. Assim, para avaliar a participação do NO sobre as respostas vasculares foram realizadas curvas de relaxamento induzido por leptina após incubação com L-NAME. Os resultados mostram que houve abolição do relaxamento induzido pela leptina nos grupos estudados, demonstrando que o relaxamento induzido pela leptina em aorta de ratos controle e obeso é totalmente dependente da liberação de NO.

Lembo et al.⁽³⁶⁾ e Vecchione et al.⁽¹¹²⁾ mostram que em anéis de aorta ratos *Kyoto* normotensos de 12 a 14 semanas, o relaxamento provocado pela leptina é abolida pelo L-NAME que, conseqüentemente, inibe a função do óxido nítrico endotelial. No entanto, Sahin e Bariskaner⁽³⁵⁾ demonstram que o pré-tratamento dos anéis da aorta de coelhos com L-NAME, não aboliu totalmente o relaxamento máximo à leptina. Os autores sugerem que os efeitos relaxantes da leptina são mediados em parte pelo NO e por outro fator liberado pelo endotélio⁽³⁵⁾. Cabe ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram a participação da leptina na produção e liberação de NO no endotélio vascular, bem como há carência de informações sobre a resposta vascular à leptina em animais induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica insaturada.

Em conclusão, a obesidade induzida por dieta hiperlipídica insaturada acarreta diminuição da resposta contrátil sem alteração da resposta vasodilatadora. A resposta contrátil à Fe é, provavelmente, resultante de maior participação da via nitrérgica (NO) nos animais obesos. Além disso, os achados evidenciam que as respostas relaxantes induzidas pela leptina e acetilcolina não estão alteradas em função da obesidade, mas são dependentes da liberação do NO. Futuros estudos são necessários para avaliar a participação de outros mediadores na resposta vascular sob a influência da obesidade.

6- REFERÊNCIAS

1. Suastika K. Update in The management of obesity. *Acta Med Indones.* 2006;38(4):231-7.
2. World Health Organization. Obesity and Overweight. [access 2015 mar 11]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009.
4. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404(6778):635-43.
5. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Obesidade: etiologia. In: Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO. 3 ed. São Paulo: AC Farmacêutica, 2009. p. 17-22.
6. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2522-5.
7. Francischi RPP, Pereira LO, Freitas CS, Klopfer M, Santos RC, Vieira P, Lancha JAH. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev. Nutr.* 2000;13(1):17-28.
8. Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Bal MJF, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280(6):E827-47.
9. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics (São Paulo).* 2007;62(1):77-86.
10. Kumanyika SK, Obarzanek E, Stettler N, Bell R, Field AE, Fortmann SP, et al. Population-based prevention of obesity. *Circulation.* 2008;118(4):428-64.
11. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):968-76.
12. Acree L S, Comp PC, Whitsett TL, Montgomery PS, Nickel KJ, Fjeldstad AS, et al. The influence of obesity on calf blood flow and vascular reactivity in older adults. *Dyn. Med.* 2007;6(4):1-8.
13. Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology.* 2008;15(2):79-89.
14. Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JPH, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing

- insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci (Lond)*. 2001;101(5):499-506.
15. Naderali EK, Pickavance LC, Wilding JPH, Williams G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100(6):635-41.
 16. Fatani S, Pickavance LC, Sadler CJ, Harrold JA, Cassidy R, Wilding JPH, et al. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. *Nutr Metab (Lond)*. 2007;4:15:1-6.
 17. Jerez S, Scacchi F, Sierra L, KArbiner S, Bruno MP. Vascular Hyporeactivity to Angiotensin II and Noradrenaline in a Rabbit Model of Obesity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59(1):49–57.
 18. Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, et al. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res*. 2007;73(2):368-75.
 19. Nascimento TB, Baptista RFF, Pereira PC, Campos DHS, Leopoldo AS, Leopoldo APL, et al. Alterações Vasculares em Ratos Obesos por Dieta Rica em Gordura: Papel da Via L-arginina/NO Endotelial. *Arq Bras Card*. 2011;97(1): 40-5.
 20. Nascimento TB, Campos DHS, Alves CAB, Cicogna AC, Cordellini AS. A possible Increase of Activity of Endothelial L-Arginine/Nitric Oxide Pathway in Aortas of Diet-Induced Obesity Rats. *Endocrinol Metabol Syndrome*. 2011;1:1-7.
 21. Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and disease. *Curr Diab Rep*. 2005;5(4):260-6.
 22. Maenhaut N, Voorde JV. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med*. 2011;9:25.
 23. Brandão AF, Pinge MCM. Alterações do óxido nítrico na função cardiovascular pelo treinamento físico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2007;28(1):53-68.
 24. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1(11):1155-61.
 25. Júnior DJ, Pedrosa RG, Tirapegui J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2004;40(3):273-87.

26. Negrão AB, Licinio J. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000;44(3):205-14.
27. Leung YM, Kwan CY. Dual vascular effects of leptin via endothelium: hypothesis and perspective. *Chin J Physiol.* 2008;51(1):1-6.
28. Vieira PMMM. Leptina: um modulador central das respostas imunes [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, USP; 2011.
29. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995;83(7):1263-71.
30. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 2006;393(Pt 1):7-20.
31. De Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-I expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol.* 2008;8:12: 1-8.
32. Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(2):R547-52.
33. Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, et al. Impaired longchain fatty oxidation and contractile dysfunction in the obese zucker rat heart. *Diabetes.* 2002; 51(8):2587-95.
34. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 2006;48(1):65-72.
35. Sahin, AS, Bariskaner H. The mechanisms of vasorelaxant effect of leptin on isolated rabbit aorta. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007;21(6):595-600.
36. Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, D'amati G, et al. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes.* 2000;49(2):293-7.
37. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics.* 1996;34(3):389-98.
38. Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):R1357-64.
39. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CRN, Novelli ELB, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008;41(3):253-9.

40. Lima-Leopoldo AP. Influência do tempo de exposição à obesidade sobre a expressão gênica e protéica do sistema regulador do trânsito de cálcio miocárdico [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, UNESP; 2010.
41. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000;35(4):1009-15.
42. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(4):H1534-9.
43. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, Zornoff LM, Matsubara BB. Myocardial remodeling chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86(2):126-30.
44. Halpern A, Mancini MC. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2000;7(2):166-71.
45. Pedro MA, Coimbra SR, Colombo FMC. Métodos de investigação do endotélio. In: Da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 57-68.
46. Marín J, Sánchez-Ferrer CF, Salaices M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol*. 1988;93(1):43-52.
47. Balarini CM. Avaliação dos efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental [tese]. Vitória: Ciências Fisiológicas, UFES; 2013.
48. Angeli JK. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos [dissertação]. Vitória: Ciências Fisiológicas, UFES; 2009.
49. Furchgott RF. Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. *Circ Res*. 1983;53(5):557-73.
50. Bermudez OI, Tucker KL. Tendências em padrões alimentares das populações latino-americanas. *Cad Saude Publica*. 2003;19(1):87-99.
51. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes Ndos S, Monteiro CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saude Publica*. 2005;39(4):530-40.
52. Rosini TC, Silva AS, Moraes Cd. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(3):383-7.
53. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270-99.

54. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(6):968-74.
55. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DC, Nascimento AF, Campos DH, Luvizotto Rde A, et al. Influence of Long-Term Obesity on Myocardial Gene Expression. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(3):229-37.
56. Keita H, Ramírez-San JE, Paniagua-Castro N, Garduño-Siciliano L, Quevedo L. The long-term ingestion of a diet high in extra virgin olive oil produces obesity and insulin resistance but protects endothelial function in rats: a preliminary study. *Diabetol Metab Syndr.* 2013;5(1):1-10.
57. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, da Silva DCT, do Nascimento AF, de Campos DHS, Luvizotto RAM, et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. *J Appl Physiol.* 2014;117(6):669-78.
58. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003;133(4):1081-7.
59. White PA, Cercato LM, Araújo JM, Souza LA, Soares AF, Barbosa AP, et al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(5):339-45.
60. Duarte ACGO, Fonseca DF, Manzoni MSJ, Soave CF, Sene-Fiorese M, Dâmaso AR, et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev. Nutr.* 2006;19(3):341-48.
61. Freire PP, Alves CA, Deus AF, Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DC, et al. Obesity does not Lead to Imbalance Between Myocardial Phospholamban Phosphorylation and Dephosphorylation. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(1):41-50.
62. Warwick ZS. Probing the Causes of High-Fat Diet Hyperphagia: A Mechanistic and Behavioral Dissection. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996;20(1):155-61.
63. Pereira LO; Francischi RP; Lancha Jr AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(2):111-27.
64. Costa MC, Brito LL, Lessa I. Práticas alimentares associadas ao baixo risco cardiometabólico em mulheres obesas assistidas em ambulatórios de referência do Sistema Único de Saúde: estudo de caso-controle. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2014;23(1):67-78.
65. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, do Nascimento AF, Luvizotto Rde A, de Campos DH, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* 2010;26(8):423-9.


66. Campos DH, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Oliveira-Junior SA, Silva DC, et al. Obesity Preserves Myocardial Function During Blockade of the Glycolytic Pathway. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(4):330-7.
67. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts?. *Circulation.* 2003;108(13):1546-51.
68. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med.* 2005;56:45-62.
69. Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(6):318-30.
70. Dietschy JM. Dietary Fatty Acids and the Regulation of Plasma Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentrations. *J Nutr.* 1998;128(2):444S-448S.
71. Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AM, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(1Supl.3):1-40.
72. du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(4):346-54.
73. Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes.* 2007;31(11):1652-9.
74. Barroso SG, Abreu VG, Francischetti EA. A Participação do Tecido Adiposo Visceral na Gênese da Hipertensão e Doença Cardiovascular Aterogênica. Um Conceito Emergente. *Arq Bras Cardiol.* 2002;78(6):618-30.
75. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RA, et al. Myocardial Dysfunction and Abnormalities in Intracellular Calcium Handling in Obese Rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(3):232-40.
76. Silva DC, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DH, Nascimento AF, Oliveira Junior SA, et al. Influence of Term of Exposure to High-Fat Diet-Induced Obesity on Myocardial Collagen Type I and III. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(2):157-63.
77. Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens.* 2001;8:63-75.
78. Silva EA, Flexa F, Zanella MT. Abdominal Obesity, Insulin Resistance and Hypertension: Impact on Left Ventricular Mass and Function in Women. *Arq Bras Cardiol.* 2007;89(2):77-82.
79. Oliveira EM, Krieger JE. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico: Aspectos moleculares. *Hipertensão.* 2002;5(2):73-8.

80. Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension*. 2005;45(1):9-14.
81. Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(2):R547-52.
82. Carroll JF, Jones AE, Hester RL, Reinhart GA, Cockrell K, Mizelle HL. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension*. 1997;30(6):1376-81.
83. Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, et al. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulinresistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*. 2004;53(9):2366-74.
84. Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of Leptin Signaling Contributes to Cardiac Hypertrophy Independently of Body Weight in Mice. *Circulation*. 2003;108(6):754-9.
85. Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac Myocyte Apoptosis Is Associated With Increased DNA Damage and Decreased Survival in Murine Models of Obesity. *Circ Res*. 2006;98(1):119-24.
86. Ricci E, Smallwood S, Chouabe C, Mertani HC, Raccurt M, Morel G, et al. Electrophysiological Characterization of Left Ventricular Myocytes from Obese Sprague-Dawley Rat. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(5):778-86.
87. de Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res*. 1997;38(7):1384-94.
88. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(6):3077-82.
89. Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H38-44.
90. McLennan PL, Barnden LR, Bridle TM, Abeywardena MY, Charnock JS. Dietary fat modulation of left ventricular ejection fraction in the marmoset due to enhanced filling. *Cardiovasc Res*. 1992;26(9):871-7.
91. Pepe S, McLennan PL. Cardiac Membrane Fatty Acid Composition Modulates Myocardial Oxygen Consumption and Postischemic Recovery of Contractile Function. *Circulation*. 2002;105(19):2303-8.


92. Takahashi R, Okumura K, Asai T, Hirai T, Murakami H, Murakami R, et al. Dietary fish oil attenuates cardiac hypertrophy in lipotoxic cardiomyopathy due to systemic carnitine deficiency. *Cardiovasc Res.* 2005;68(2):213-23.
93. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(7121):875-80.
94. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14367-72.
95. Schulman IH, Zhou MS, Raji L. Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension. *J Hypertens.* 2006;24:S45–50.
96. Zemel MB, Reddy S, Shehin SE, Lockette W, Sowers JR. Vascular reactivity in Zucker obese rats: role of insulin resistance. *J. Vasc. Med. Biol.* 1990;2:81-85.
97. Hopfner RL, McNeill JR, Gopalakrishnan V. Vanadate treatment normalizes exaggerated vascular smooth muscle responses in the obese Zucker rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1998;357:61-65.
98. Zhong H, Minneman KP. Alpha 1-adrenoceptor subtype. *Eur J Pharmacol.* 1999;375(1-3):261-76.
99. Minneman KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol Rev.* 1988;40(2):87-119.
100. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000;522(2):177-85.
101. Bautista R, Carreón-Torres E, Luna-Luna M, Komera-Arenas Y, Franco M, Fragoso JM, et al. Early endothelial nitrosylation and increased abdominal adiposity after long-term consumption of frying used canola oil in Wistar rats. *Nutrition.* 2014;30(9):1055-60.
102. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.* 1997;49(2):137-42.
103. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004;93(1):105-13.
104. Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(23):11259-63.

105. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52(3):352-7.
106. Félétou M, Vanhoutte PM. The alternative: EDHF. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):15-22.
107. Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1988;95(1):189-96.
108. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(8):374-80.
109. Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* 1998;44(8 Pt 2):1809-19.
110. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(6):1215-25.
111. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 2006 Apr 18;113(15):1888-904.
112. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes.* 2002;51(1):168-73.
113. Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39(2):168-78.
114. Frühbeck G. Pivotal Role of Nitric Oxide in the Control of Blood Pressure After Leptin Administration. *Diabetes.* 1999;48(4):903-8.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 027/2014, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Participação do receptor de leptina na reatividade vascular em anéis de aorta de ratos obesos."** que tem como responsável o (a) docente **Andre Soares Leopoldo**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 03/10/14.



Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 03 de outubro de 2014.